

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALINE BRUM ARGENTA

PROCESSAMENTO DOS SOROS DE LEITE BOVINO, CAPRINO E BUBALINO:
ULTRAFILTRAÇÃO, EMULSIFICAÇÃO E TRATAMENTO ENZIMÁTICO

CURITIBA

2020

ALINE BRUM ARGENTA

PROCESSAMENTO DOS SOROS DE LEITE BOVINO, CAPRINO E BUBALINO:
ULTRAFILTRAÇÃO, EMULSIFICAÇÃO E TRATAMENTO ENZIMÁTICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL) – Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Agnes de Paula Scheer
Coorientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira

CURITIBA

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE – SIBI/UFPR

F689p

Argenta, Aline Brum

Processamento dos soros de leite bovino, caprino e bubalino:
ultrafiltração, emulsificação e tratamento enzimático / Aline Brum
Argenta. Curitiba, 2020.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de
Alimentos (PPGEAL) – Setor de Tecnologia da Universidade Federal do
Paraná, como requisito à obtenção do título de Doutor em Engenharia de
Alimentos

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Agnes de Paula Scheer

Coorientador: Prof. Dr. Alessandro Nogueira

1. Leite - proteína. 2. Soro de leite. I. Scheer, Agnes de Paula. II.
Nogueira, Alessandro. I. Título.

CDD 637.1

Bibliotecária: Vilma Machado CRB9/1563



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS - 40001016019P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ALINE BRUM ARGENTA** intitulada: **Processamento dos soros de leite bovino, caprino e bubalino: ultrafiltração, emulsificação e tratamento enzimático**, sob orientação da Profa. Dra. AGNES DE PAULA SCHEER, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 17 de Fevereiro de 2020.

AGNES DE PAULA SCHEER
Presidente da Banca Examinadora

ROSEMARY HOFFMANN RIBANI
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

LUANA CAROLINA BOSMULER ZUGE
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

STELA MARIS MEISTER MEIRA
Avaliador Externo (INSTITUTO FEDERAL DE EDUC., CIÊNC. E TECN.
SUL-RIO-GRANDENSE)

MICHELE RIGON SPIER
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por mais esta etapa concluída, pela força e conforto em todas as horas, de dificuldade, alegrias, angústias e conquistas.

Agradeço aos meus pais, Cleber Jone T. Argenta e Liane Maria B. Argenta, pelo apoio incondicional, por serem minha base e minha motivação. Agradeço por estarem comigo em todos os momentos, por sempre incentivarem meus estudos e por cada esforço que fizeram para que eu pudesse hoje celebrar mais essa conquista junto a vocês.

Aos meus irmãos, Rodrigo B. Argenta e Luiza B. Argenta, e cunhados Aline Otte e Francisco Gazola, que sempre torceram por mim e estiveram ao meu lado, mesmo que não fisicamente, tornando meus dias mais divertidos e especiais. Agradeço por ter vocês como irmãos, amigos e por estarem comigo neste momento de conquista.

Ao meu futuro esposo, André Irazoqui de Lima, que sempre me apoiou na busca dos meus sonhos, que com seu carinho, suporte e compreensão me ajudou a superar cada desafio. Sou grata por todo companheirismo, por ter mudado tudo na tua vida para estar ao meu lado em cada momento destes quatro anos do doutorado.

Agradeço imensamente a minha orientadora, Agnes de Paula Scheer, pela oportunidade, por dividir comigo seus conhecimentos, pela atenção, paciência e disponibilidade prestadas a mim. Sua motivação, dedicação e exemplos como pessoa e profissional serão para sempre minha inspiração.

Ao meu coorientador, Alessandro Nogueira, por todos ensinamentos, apoio e suporte durante a realização desta pesquisa. Obrigada por aceitar este desafio, pela confiança e por suas contribuições a este trabalho.

Aos demais professores que fizeram parte de minha formação, que contribuíram com seus ensinamentos, que foram meus exemplos e conselheiros.

À Universidade Federal do Paraná e ao PPGEAL, por toda estrutura e oportunidade concedida para realização deste trabalho e contribuição para minha formação, acadêmica e pessoal.

À Escola de Tecnologia de Leite e Queijo dos Campos Gerais (ETLQueijos), da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela doação das amostras de soro de leite e pelos conhecimentos durante o X Curso de Extensão em Fabricação de Queijos.

Às empresas Granotec e Alibra, por doarem gentilmente as amostras de enzima e soro de leite em pó, respectivamente.

Agradeço com eterno carinho ao técnico de laboratório, Jair José de Lima, por toda ajuda durante a realização deste trabalho, pela disposição e profissionalismo.

Ao Laboratório de Análise de Alimentos do Programa de Pós-graduação em Alimentação e Nutrição, Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos (LACAUT) e Laboratório de Engenharia Ambiental Professor Francisco Borsari Netto (LABEAM) por disponibilizar sua infraestrutura para realização de parte desta pesquisa.

Aos colegas e amigos do EMULTEC, pela convivência, pelas conversas e por dividirem suas experiências e conhecimentos. Agradeço também pelos momentos de descontração que fizeram esta caminhada muito mais leve.

Ao aluno de iniciação científica Matheus, por me auxiliar na realização deste trabalho, por se fazer sempre disponível e prestativo.

Aos demais colegas da pós-graduação pela amizade e troca de conhecimentos.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

RESUMO

O soro de leite, produzido em grande volume a partir da produção de queijos, possui potencial poluidor que pode ser superior ao esgoto doméstico. Sua característica poluidora dificulta seu descarte e é atribuída a sua rica composição nutricional. Logo, alguns estudos vêm buscando alternativas, no sentido de reduzir o impacto ambiental causado pelo descarte incorreto do soro de leite e ao mesmo tempo promover a recuperação de componentes nutricionalmente valiosos. No entanto, o descarte do soro de leite ainda é uma prática frequente e, dentre os processos já estudados, não há metodologia que vise à concentração das proteínas e a hidrólise enzimática da lactose de forma simultânea. Este processo tornaria o permeado da ultrafiltração do soro de leite útil para o emprego em produtos destinados às pessoas intolerantes à lactose. Neste sentido, o presente trabalho possui como principal objetivo avaliar o processamento do soro de leite bovino, caprino e bubalino, por meio de separação por membranas e processo enzimático, bem como, avaliar a aplicação dos concentrados proteicos no preparo de emulsões. As melhores condições operacionais do processo de ultrafiltração (UF) foram determinadas por meio de delineamento composto central rotacional (DCCR), utilizando a amostra de soro de leite bovino reconstituído, sendo obtida concentração proteica de aproximadamente 37 g L^{-1} , a 60 kPa e 40 °C. A UF dos soros de leite de cabra e de búfala resultou em menor fluxo de permeado, provavelmente devido aos elevados teores de proteínas e cálcio. O melhor ajuste foi verificado pelo modelo de Ho e Zydney, o qual sugere que o *fouling* ocorre devido ao bloqueio dos poros e posterior depósito na superfície da membrana. A hidrólise da lactose foi investigada com a enzima β -galactosidase de origem do micro-organismo *Kluyveromyces lactis*, na forma livre e imobilizada em esferas de alginato. Observou-se maior atividade em pH 7,0 e a 35 °C, para ambas as formas da enzima. Notou-se maior estabilidade para a enzima imobilizada, possivelmente pela proteção conferida à enzima pelas esferas de alginato, o que reduziu a transferência de massa e, conseqüentemente, resultou em menor conversão de lactose em comparação à enzima livre. Além disso, foi proposto um procedimento experimental integrado, hidrólise-UF, que possibilitou a concentração das proteínas e hidrólise enzimática da lactose de forma simultânea, proporcionando diminuição do tempo de processo. Ainda, investigaram-se os concentrados proteicos quanto à propriedade de emulsificação, onde foram observados melhores resultados a pH 7,0 para todas as amostras avaliadas. Comparando-se a origem das diferentes proteínas empregadas, verificou-se melhor desempenho para os concentrados de origem caprina e bubalina, com geração de emulsões mais estáveis, com maior viscosidade e menor tensão superficial e tamanho de gotas. Observou-se que a desnaturação das proteínas do soro, pré-homogeneização, a 80 °C por 20 min, influencia de forma positiva a estabilidade das emulsões. Constatou-se que a interação das proteínas do soro com o Tween 80 permite a utilização de menor concentração de compostos sintéticos para estabilizar emulsões O/A. Assim, espera-se com este trabalho, contribuir para a recuperação dos principais e mais valiosos componentes do soro de leite, agregando valor e evitando seu descarte, bem como, minimizar o impacto ambiental causado.

Palavras-chave: Proteínas do soro de leite; Lactose; Hidrólise; Ultrafiltração; Emulsões.

ABSTRACT

Whey, produced in large volume from the production of cheeses, has a polluting potential that may be higher than domestic sewage. Its polluting characteristic makes it difficult to dispose of and is attributed to its rich nutritional composition. Therefore, some studies have been looking for alternatives in order to reduce the environmental impact caused by the incorrect discarding of whey and at the same time promote the recovery of nutritionally valuable components. However, the discarding of whey is still a frequent practice and, among the processes already studied, there is no methodology that focuses on protein concentration and enzymatic hydrolysis of lactose simultaneously. This process would make whey permeate from ultrafiltration process useful for use in products intended for lactose intolerant people. In this sense, the present work has as main objective to evaluate the processing of bovine, goat and buffalo whey, by means of membrane separation and enzymatic process, as well as to evaluate the application of protein concentrates in the preparation of emulsions. The best operating conditions of the ultrafiltration process (UF) were determined by means of the central rotational compound (DCCR), using the whey powder sample, obtaining a protein concentration of approximately 37 g L^{-1} , at 60 kPa and 40 °C. UF process of goat and buffalo whey resulted in lower permeate flux, probably due to high protein and calcium contents. The best fit was verified by the Ho and Zydney model, which suggests that fouling occurs due to pore blocking and subsequent deposition on the membrane surface. The hydrolysis of lactose was investigated with the enzyme β -galactosidase from the microorganism *Kluyveromyces lactis*, in free form and immobilized on alginate beads. It was observed higher activity at pH 7.0 and at 35°C for both forms of the enzyme. Greater stability was observed for the immobilized enzyme, possibly due to the protection afforded to the enzyme by the alginate beads, which also tended to reduce mass transfer and, consequently, resulted in a lower conversion of lactose compared to the free enzyme. In addition, an integrated experimental procedure, hydrolysis-UF, was proposed, which enabled the protein concentration and the enzymatic hydrolysis of lactose simultaneously, allowing a reduction of the process time. Furthermore, protein concentrates were investigated for emulsification property, where better results were observed at pH 7.0 for all samples evaluated. Comparing the origin of the different proteins employed, it was found a better performance for goat and buffalo concentrates, with generation of more stable emulsions, with higher viscosity and lower surface tension and droplet size. Denaturation of whey protein homogenization at 80 °C for 20 min positively influences emulsion stability. The interaction of whey proteins with Tween 80 has been found to allow the use of lower concentrations of synthetic compounds to stabilize O/W emulsions. Thus, it is hoped with this work, to contribute to the recovery of the main and most valuable components of whey, adding value and avoiding its disposal, as well as minimize the environmental impact caused.

Keywords: Whey protein; Lactose; Hydrolysis; Ultrafiltration; Emulsions.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA GERAL DA ELABORAÇÃO DE QUEIJO.	19
FIGURA 2 - ESTRUTURA DA LACTOSE.	23
FIGURA 3 - ESQUEMA DO PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS.....	30
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE EMULSÕES ÓLEO-EM-ÁGUA (A), ÁGUA-EM-ÓLEO (B), ÁGUA-EM-ÓLEO-EM-ÁGUA (C) E ÓLEO-EM-ÁGUA-EM-ÓLEO (D).	38
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DOS PROCESSOS DE DECOMPOSIÇÃO DE EMULSÕES.	39
FIGURA 6 - ESQUEMA DO PROCESSO DE HIDRÓLISE DA LACTOSE.	46
FIGURA 7 - MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.	48
FIGURA 8 - MÓDULO UTILIZADO DURANTE O PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO, COMPOSTO POR BOMBA E MEMBRANA PLACA-QUADRO.	61
FIGURA 9 - DIAGRAMA DE PARETO COM O EFEITO ESTIMADO DAS VARIÁVEIS NO PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO BOVINO RECONSTITUÍDO POR UF.	70
FIGURA 10 - GRÁFICO DOS RESÍDUOS (A), GRÁFICO DOS VALORES PREDITOS VERSUS VALORES EXPERIMENTAIS DO MODELO QUADRÁTICO (B).....	71
FIGURA 11 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E CURVA DE CONTOURNO (B) PARA CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO BOVINO RECONSTITUÍDO COMO FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DA PRESSÃO TRANSMEMBRANA.	72
FIGURA 12 - EFEITO DA TEMPERATURA E ΔP NO FLUXO DE PERMEADO DURANTE O PROCESSO UF DO SORO DE LEITE BOVINO RECONSTITUÍDO.	75
FIGURA 13 - EFEITO DA PRESSÃO TRANSMEMBRANA NO COMPORTAMENTO DO FLUXO DE PERMEADO DURANTE A ULTRAFILTRAÇÃO DA ÁGUA E AMOSTRAS DE SORO A 30 °C... ..	77
FIGURA 14 - AMOSTRA DE SORO DE LEITE BOVINO ANTES DA UF (A) E AMOSTRAS DE CONCENTRADO (B) E PERMEADO (C) APÓS O PROCESSO DE UF, A 30 °C E 50 KPA.	79
FIGURA 15 - FLUXO DE PERMEADO VERSUS TEMPO PARA CADA AMOSTRA DE SORO SUBMETIDA À UF EM BATELADA, SOB CONDIÇÕES DE 30 °C E 50 KPA.	80
FIGURA 16 - PERFIL DO FLUXO DE PERMEADO E FATOR DE CONCENTRAÇÃO AO LONGO DO PROCESSO DE UF DO SORO DE LEITE BOVINO FRESCO, A 30 °C E 50 KPA.	81
FIGURA 17 - AJUSTE DOS MODELOS DE BLOQUEIO DE POROS E HO-ZYDNEY AOS DADOS DE FLUXO DE PERMEADO DURANTE A UF DO SORO DE LEITE DE BÚFALA, A 30 °C E 50 KPA.	84
FIGURA 18 - SISTEMA UTILIZADO PARA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA NAS ESFERAS DE ALGINATO.	91
FIGURA 19 - ESFERAS DE ALGINATO CONTENDO A ENZIMA B-GALACTOSIDASE IMOBILIZADA.	98
FIGURA 20 - EFEITO DO PH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA, A 37 °C E UTILIZANDO ONPG.....	99

FIGURA 21 - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA, A PH 7,0 E UTILIZANDO ONPG COMO SUBSTRATO.....	101
FIGURA 22 - ESTABILIDADE TÉRMICA DA ENZIMA B -GALACTOSIDASE LIVRE E IMOBILIZADA.	102
FIGURA 23 - CINÉTICA DA HIDRÓLISE DA LACTOSE PRESENTE NO SORO BOVINO RECONSTITUÍDO, A 35 °C, PH 7,0.	103
FIGURA 24 - ESTABILIDADE OPERACIONAL DA ENZIMA B-GAL IMOBILIZADA DURANTE HIDRÓLISE DA LACTOSE DO SORO DE LEITE A 35 °C, PH 7,0 E CICLOS DE 50 MIN CADA.	109
FIGURA 25 - ESTABILIDADE DA ENZIMA B-GAL AO ARMAZENAMENTO A 4 °C, PH 4,5, POR PERÍODO DE 90 DIAS.	110
FIGURA 26 - INFLUÊNCIA DO PRÉ-AQUECIMENTO A 80 °C, DURANTE 20 MIN, NA ATIVIDADE EMULSIFICANTE DOS CONCENTRADOS PROTEICOS A PH 7,0.	125
FIGURA 27 - INFLUÊNCIA DO PRÉ-AQUECIMENTO A 80 °C, DURANTE 20 MIN, DOS CONCENTRADOS PROTEICOS A PH 7,0, NO ÍNDICE DE ESTABILIDADE DAS EMULSÕES.	125
FIGURA 28 - ESQUEMA DA ESTABILIZAÇÃO DA INTERFACE ÓLEO/ÁGUA PELA ADSORÇÃO DE AGREGADOS DE PROTEÍNAS DESNATURADAS.....	127
FIGURA 29 - EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO PÓS-HOMOGENEIZAÇÃO NA ESTABILIDADE DA EMULSÃO ESCF, A PH 7,0 E PRÉ-AQUECIDA.	128
FIGURA 30 - DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE GOTAS (DTG) DAS EMULSÕES PREPARADAS A PH 7,0, PRÉ-AQUECIDAS, COM CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE 2,0% (ESBR E ESBF) E 1,5% (ESCF E ESBUF).....	131
FIGURA 31 - DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE GOTAS (DTG) DE EMULSÕES COM PROTEÍNAS DO SORO DE BÚFALA A 1,5%, PREPARADAS A PH 7,0, COM E SEM PRÉ-AQUECIMENTO.	132
FIGURA 32 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE DE CABRA NA TENSÃO SUPERFICIAL DE UMA EMULSÃO PREPARADA A PH 7,0 E PRÉ-AQUECIDA.	135
FIGURA 33 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SURFATANTE TWEEN 80 NA TENSÃO SUPERFICIAL DE UMA EMULSÃO ÓLEO:SOLUÇÃO SALINA 25:75 (V/V), A PH 7,0.....	136
FIGURA 34 - CURVAS DE VISCOSIDADE DAS EMULSÕES PREPARADAS A PH 7,0, PRÉ-AQUECIDAS, COM CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE 2,1% (ESBR E ESBF) E 1,7% (ESCF E ESBUF).....	137
FIGURA 35 - CURVAS DE VISCOSIDADE PARA EMULSÕES COM PROTEÍNAS DO SORO DE BÚFALA A 1,7% COM E SEM PRÉ-AQUECIMENTO (ESBUF E ESBUF CONTROLE), E COM 1% DE CADA SURFATANTE (PROTEÍNA + TWEEN 80, 1:1).....	139

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO SORO DE LEITE DOCE E ÁCIDO, DE ORIGEM BOVINA.....	21
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DE VITAMINAS E MINERAIS DO SORO DE LEITE DE ORIGEM BOVINA.....	22
TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE BOVINO.....	26
TABELA 4 - PROPRIEDADES FUNCIONAIS TECNOLÓGICAS CONFERIDAS AOS ALIMENTOS PELOS CONCENTRADOS PROTEICOS.	28
TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS DOS DIFERENTES PSM.....	32
TABELA 6 - COMPILAÇÃO BIBLIOGRÁFICA DO PROCESSO DE UF APLICADO AO SORO DE LEITE.....	34
TABELA 7 - CLASSIFICAÇÃO DOS SURFATANTES DE ACORDO COM A SUA POLARIDADE.....	41
TABELA 8 - VALORES DE BHL E RESPECTIVA APLICAÇÃO.....	42
TABELA 9 - PESQUISAS RECENTES DE FORMAÇÃO DE EMULSÕES COM PROTEÍNAS DO SORO.	43
TABELA 10 - PROPRIEDADES DE B-GALACTOSIDASES OBTIDAS POR DIFERENTES MICRO-ORGANISMOS.....	46
TABELA 11 - VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.	48
TABELA 12 - COMPILAÇÃO BIBLIOGRÁFICA DE ESTUDOS DA HIDRÓLISE DA LACTOSE DO SORO DE LEITE.....	50
TABELA 13 - VALORES REAIS E CODIFICADOS PARA O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DOS ENSAIOS DE ULTRAFILTRAÇÃO.	62
TABELA 14 - MODELOS MATEMÁTICOS DE BLOQUEIO DE POROS.....	65
TABELA 15 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SORO BOVINO RECONSTITUÍDO E SOROS BOVINO, CAPRINO E BUBALINO FRESCOS.....	67
TABELA 16 - MATRIZ DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR).	69
TABELA 17 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA).	71
TABELA 18 - COEFICIENTES DE REJEIÇÃO OBTIDOS PARA OS ENSAIOS DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.	73
TABELA 19 - FLUXOS DE PERMEADO OBTIDOS PARA OS ENSAIOS DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.	74
TABELA 20 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS SOROS, CONCENTRADOS E PERMEADOS OBTIDOS DO PROCESSO DE UF, A 30 °C E 50 KPA.....	79
TABELA 21 - VALORES ESTIMADOS DAS RESISTÊNCIAS DO PROCESSO DE UF DAS AMOSTRAS DE SORO.	82
TABELA 22 - MODELAGEM DOS DADOS DE FLUXO DE PERMEADO.	83

TABELA 23 - INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO SOBRE AS CONSTANTES CINÉTICAS.....	105
TABELA 24 - RESULTADOS OBSERVADOS PARA O PROCESSO HIDRÓLISE-UF COM ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA, A 35 °C, 50 KPA, PH 7,0, DURANTE 50 MIN.	106
TABELA 25 - COMPARAÇÃO ENTRE O PROCESSO INTEGRADO HIDRÓLISE-UF (ENZIMA IMOBILIZADA) E O PROCESSO DE UF INDEPENDENTE.....	107
TABELA 26 - CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE NAS AMOSTRAS DE CONCENTRADO E PERMEADO OBTIDAS APÓS O PROCESSO INTEGRADO HIDRÓLISE-UF COM ENZIMA IMOBILIZADA.....	108
TABELA 27 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E PH NO ÍNDICE DE ATIVIDADE EMULSIFICANTE (IAE), ÍNDICE DE ESTABILIDADE DA EMULSÃO (IEE) E ÍNDICE DE FORMAÇÃO DE CREME (IC) DAS EMULSÕES COM CONCENTRADOS PROTEICOS DO SORO.....	121
TABELA 28 - ÍNDICE DE FORMAÇÃO DE CREME (%) A PH 7,0 E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE 2,0% (ESBR E ESBF) E 1,5% (ESCF E ESBUF).	126
TABELA 29 - INFLUÊNCIA DA RAZÃO DE SURFATANTE NA ESTABILIDADE DAS EMULSÕES.	133
TABELA 30 - MEDIDAS DE TENSÃO SUPERFICIAL (MN/M) OBTIDAS QUANDO APLICADA A CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE 2,1% (ESBR E ESBF) E 1,7% (ESCF E ESBUF) EM EMULSÕES PREPARADAS A PH 7,0.....	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijo
ANOVA	Análise de variância
APLV	Alergia à proteína do leite de vaca
BHL	Balanço hidrofílico lipofílico
CMC	Concentração micelar crítica
CR	Coeficiente de rejeição
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DNS	Dinitrosalicílico
DQO	Demanda química de oxigênio
DTG	Distribuição do tamanho de gotas
EI	Eficiência da imobilização
ESBF	Emulsão com concentrado de soro bovino fresco
ESBR	Emulsão com concentrado de soro bovino reconstituído
ESBUF	Emulsão com concentrado de soro bubalino fresco
ESCF	Emulsão com concentrado de soro caprino fresco
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FC	Fator de concentração
IAE	Índice de atividade emulsificante
IC	Índice de formação de creme
IEE	Índice de estabilidade da emulsão
MF	Microfiltração
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
NF	Nanofiltração
ONP	Ortho-nitrophenyl
ONPG	Ortho-nitrophenyl- β -D-galactoside
PSM	Processo de separação por membranas
RI	Rendimento da imobilização
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SQR	Soma dos quadrados dos resíduos
UF	Ultrafiltração
VB	Valor biológico
WPC	Whey protein concentrate
WPI	Whey protein isolate
α -La	α -lactoalbumina
β -Lg	β -lactoglobulina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS	17
Objetivo geral	17
Objetivos específicos	17
CAPÍTULO I	18
REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1 SORO DE LEITE	19
1.1.1 Composição do soro de leite	21
1.1.2 Lactose	23
1.1.3 Proteínas do soro	25
1.1.3.1 Separação e aproveitamento das proteínas do soro de leite	27
1.2 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS (PSM)	29
1.2.1 Tipos de membranas e processos	31
1.2.2 Fenômenos que limitam o fluxo de permeado	32
1.2.3 Ultrafiltração	33
1.3 EMULSÕES	37
1.3.1 Emulsificantes	40
1.3.2 Emulsões com proteínas do soro e análises de caracterização	42
1.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA LACTOSE	45
1.4.1 Imobilização de enzimas	47
1.4.2 Estudos de hidrólise da lactose do soro de leite	49
CAPÍTULO II	53
CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE POR ULTRAFILTRAÇÃO: AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS E DO MECANISMO DE FOULING .	53
2.1 INTRODUÇÃO	55
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	56
2.2.1 Amostras de soro de leite	56
2.2.2 Caracterização físico-química	57
2.2.3 Processo de ultrafiltração	61
2.2.3.1 Análise das resistências	63
2.2.3.2 Modelos matemáticos	64
2.2.4 Análise estatística	66
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
2.3.1 Caracterização físico-química das amostras de soro de leite	67
2.3.2 Processo de ultrafiltração do soro bovino reconstituído	68
2.3.2.1 Rejeição das proteínas do soro de leite bovino reconstituído	72
2.3.2.2 Fluxo de permeado	74
2.3.4 Processo de UF em modo batelada	78
2.3.5 Avaliação do fluxo de permeado pelos modelos matemáticos	83
2.4 CONCLUSÃO	85

CAPÍTULO III	87
HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA LACTOSE PRESENTE NO SORO DE LEITE: ENZIMA LIVRE, IMOBILIZADA E PROCESSO INTEGRADO HIDRÓLISE-UF	87
3.1 INTRODUÇÃO	89
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	90
3.2.1 Materiais utilizados	90
3.2.2 Imobilização da enzima	90
3.2.3 Processo de hidrólise	92
3.2.4 Ensaio cinético com soro de leite.....	93
3.2.5 Determinação das constantes cinéticas.....	94
3.2.6 Ensaaios de estabilidade.....	94
3.2.7 Ensaaios de hidrólise-UF com o soro de leite	95
3.2.8 Análises de caracterização	96
3.2.9 Análise estatística.....	98
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	98
3.3.1 Imobilização da β -gal.....	98
3.3.2 Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática	99
3.3.3 Cinética do processo de hidrólise da lactose	103
3.3.4 Constantes cinéticas.....	105
3.3.5 Processo integrado hidrólise-UF	106
3.3.6 Estabilidade a reutilização e ao armazenamento	108
3.4 CONCLUSÃO	111
CAPÍTULO IV.....	112
APLICAÇÃO DOS CONCENTRADOS DE PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE NO PREPARO DE EMULSÕES	112
4.1 INTRODUÇÃO	114
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	115
4.2.1 Materiais utilizados	115
4.2.2 Preparo das emulsões.....	116
4.2.3 Caracterização das emulsões.....	117
4.2.4 Análise estatística.....	120
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	120
4.3.1 Efeito do pH e concentração proteica na estabilidade das emulsões.....	120
4.3.2 Impacto do tratamento térmico na estabilidade das emulsões.....	124
4.3.3 Análise microscópica e distribuição do tamanho de gota	129
4.3.4 Influência da razão de surfatante na estabilidade das emulsões	133
4.3.5 Tensão superficial	134
4.3.6 Análise de viscosidade	137
4.4 CONCLUSÃO	139
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	141
PRODUÇÃO CIENTÍFICA	143
REFERÊNCIAS	145

INTRODUÇÃO

A produção anual de queijos no Brasil, de acordo com dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ) é de mais de um milhão de toneladas (ABIQ, 2018). Portanto, considerando-se a geração média de nove litros de soro bovino para cada quilograma de queijo produzido, tem-se grande volume de soro de leite como efluente industrial, o qual necessita de tratamento adequado devido ao impacto ambiental que pode causar se descartado incorretamente. No entanto, apesar de já ter sido considerado como resíduo, o soro de leite possui rica composição nutricional, devido principalmente à lactose e aos aminoácidos essenciais que compõe suas proteínas, além de ser fonte de vitaminas e minerais (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011).

Assim, a fim de minimizar o impacto ambiental e evitar desperdícios nutricionais e financeiros na indústria de laticínios, algumas alternativas estão disponíveis. Quando o soro é concentrado, por exemplo, vários produtos de alto valor nutricional podem ser produzidos, como sucos (AMARAL et al., 2018; CAPPATO et al., 2018), bebidas achocolatadas (MONTEIRO et al., 2018), bebidas fermentadas (SABOKBAR; KHODAIYAN, 2016), produtos de panificação (LEVIN et al., 2016; SAHAGÚN et al., 2018) e produtos lácteos, como iogurtes (GYAWALI; IBRAHIM, 2016; TORRES et al., 2018), sorvetes, sobremesas congeladas e picolés (GAJO et al., 2017; MARTINS et al., 2018).

Portanto, o desenvolvimento de processos para a recuperação e concentração de componentes do soro evita o desperdício e agrega valor a este subproduto do leite. Nos últimos anos, diversos estudos têm buscado alternativas para a exploração de componentes do soro, principalmente aqueles que envolvem a aplicação de processos de separação por membranas, como a ultrafiltração (ARUNKUMAR; MOLITOR; ETZEL, 2016; BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011; DAS et al., 2016).

Dentre os componentes que podem ser concentrados a partir do soro de leite, o grande destaque são as proteínas. Estas possuem peptídeos capazes de promover diversos efeitos positivos tanto fisiológicos como nutricionais, com propriedades antioxidante, anti-inflamatória, hipotensora, antiobesidade e

osteoprotetora (BRANDELLI et al., 2015; CORROCHANO et al., 2018; O'KEEFFE et al., 2017). Além disso, também possuem propriedades funcionais de interesse para a indústria, como solubilidade, poder emulsionante, gelificação e formação de espuma (NISHANTHI et al, 2017).

A lactose, por outro lado, quando recuperada do soro de leite possui utilização limitada. Pois, embora o consumo de produtos lácteos seja crescente, muitos indivíduos sofrem de intolerância a este carboidrato. Assim, torna-se interessante a aplicação de processos que promovam a quebra da lactose, como é o caso da hidrólise enzimática, que proporciona a obtenção dos monossacarídeos glicose e galactose (VASILEVA et al., 2016).

No entanto, ainda não há processos industriais de processamento do soro de leite que visem ao mesmo tempo seus dois principais componentes, proteínas e lactose. Deste modo, o desenvolvimento de um processo integrado de ultrafiltração e hidrólise enzimática, torna-se uma importante inovação. Pois, além de possibilitar a recuperação destes constituintes e aproveitar de suas propriedades para formulação de outros produtos, previnem-se os prejuízos do seu descarte no meio ambiente. Assim, o soro de leite passa a ser utilizado de forma integral, deixando o status de efluente ou resíduo para o de matéria-prima com alto valor agregado.

Este trabalho foi dividido em quatro capítulos. No **Capítulo 1** foi apresentada uma revisão da literatura, abordando conceitos e destacando o estado-da-arte dos processos de ultrafiltração (UF), emulsificação e hidrólise enzimática utilizando o soro de leite. No **Capítulo 2** foi avaliada a influência das variáveis pressão e temperatura, na concentração de proteínas do soro durante processo de UF, utilizando planejamento experimental. Ainda, foram investigados o fluxo de permeado e os mecanismos predominantes de *fouling* durante a UF das diferentes amostras de soro. No **Capítulo 3** foi realizada a hidrólise da lactose com enzima livre e imobilizada, e após a determinação dos melhores parâmetros de operação, o processo integrado hidrólise-UF foi aplicado às amostras de soro. No **Capítulo 4** foram elaboradas emulsões a partir dos concentrados proteicos de soro de leite. Investigou-se a estabilidade destas emulsões quanto ao pH e temperatura, bem como a interação dos concentrados com emulsificante sintético.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Promover o processamento do soro de leite de diferentes espécies, por meio de separação por membranas e hidrólise enzimática da lactose.

Objetivos específicos

- a) Determinar as características físico-químicas do soro de leite em pó reconstituído e soros de leite frescos de origem bovina, caprina e bubalina;
- b) Definir as melhores condições experimentais, de temperatura e pressão, para o processo de ultrafiltração por meio de planejamento experimental;
- c) Avaliar o processo de ultrafiltração quanto ao fluxo de permeado, fator de concentração e coeficiente de rejeição;
- d) Estudar os mecanismos resistivos presentes no processo de ultrafiltração do soro de leite;
- e) Imobilizar a enzima β -galactosidase comercial, de origem do fungo *Kluyveromyces lactis*, em esferas de alginato;
- f) Identificar as melhores condições de pH, temperatura e tempo, para a hidrólise enzimática da lactose, com enzimas livre e imobilizadas;
- g) Avaliar a estabilidade operacional e de armazenamento da β -gal imobilizada;
- h) Propor um novo processo integrado de hidrólise-UF, para concentração das proteínas e conversão da lactose, de forma simultânea;
- i) Avaliar a aplicação dos concentrados proteicos de diferentes soros de leite no preparo de emulsões e sua interação com Tween 80, por meio de análises de estabilidade, aspecto microscópico, viscosidade e tensão superficial.

CAPÍTULO I

REVISÃO DA LITERATURA

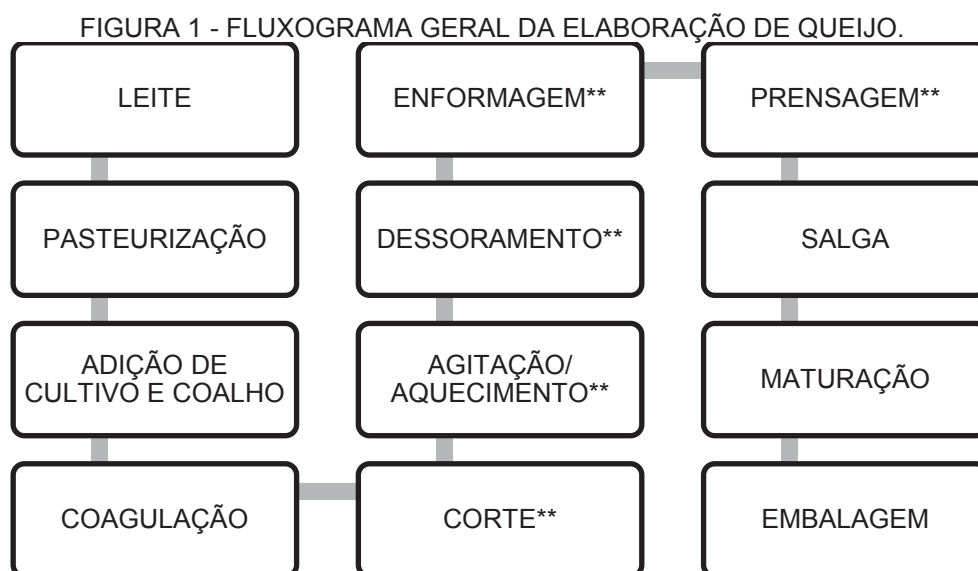
Parte deste capítulo gerou a publicação: Argenta, A.; Scheer, A. Membrane Separation Processes Applied to Whey: A Review. **Food Reviews International**. Online Taylor & Francis, em 06 de agosto de 2019. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1649694>

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 SORO DE LEITE

O queijo é um dos derivados lácteos mais produzidos mundialmente e também o que mais contribui para a geração de resíduos por parte dos laticínios, dentre os quais se destaca o soro de leite (SMITHERS, 2008).

Na fabricação de queijos, como ilustra o fluxograma da Figura 1, realiza-se a pasteurização do leite, a 72 °C durante 15 s ou 64 °C por 30 min, com posterior adição de cultura láctica e enzima que irão promover a precipitação da caseína e, conseqüentemente, a formação da coalhada. Após a coagulação, a coalhada é cortada e passa pelas etapas de agitação e aquecimento, as quais facilitarão a remoção do soro. Na etapa seguinte, o dessoramento, separa-se o soro dos grãos de coalhada, os quais são então enformados, o que confere o formato ao queijo. Finalmente, o queijo é prensado, para expulsar o excedente de soro, passando pelas etapas de salga e maturação, que dependem do tipo de queijo, antes de ser embalado (BEHMER, 1984; ORDÓÑEZ, 2005).



**Etapas onde há geração de soro.
Fonte: Adaptada de ORDÓÑEZ (2005).

Como pode ser visualizado na Figura 1, o soro de leite, obtido na produção de queijos, resulta das operações de corte, agitação, aquecimento, dessoramento,

enformagem e prensagem. O soro de leite é um líquido opaco de cor branca, amarela ou esverdeada, também denominado de soro lácteo, soro de queijo ou lacto-soro. Além de ser resíduo de queijarias, o soro pode ser obtido da produção de caseína ou de produtos lácteos similares (BRASIL, 2012; SMITHERS, 2008).

A importância deste subproduto se dá tanto pelo volume gerado, quanto pela qualidade de sua composição nutricional. O soro de leite representa cerca de 90% do volume de leite utilizado para produção de queijos, podendo variar dependendo do tipo de queijo produzido. Desta forma, em média são utilizados 10 L de leite para produção de 1 kg de queijo, com geração de 9 L de soro. Neste elevado volume estão presentes mais da metade dos sólidos do leite, onde se encontram as proteínas solúveis, lactose, vitaminas, minerais e lipídeos (ANTUNES, 2003; BYLUND, 2003; SISO, 1996).

O soro de leite pode ser classificado em soro doce ou ácido, dependendo do processo utilizado para a coagulação. O soro doce é obtido da coagulação por ação enzimática, deve possuir pH entre 6,0 e 6,8 e resulta principalmente do processamento de queijos Cheddar, Provolone, Suíço e *Mozzarella*. Enquanto que o soro ácido é proveniente da desestabilização das caseínas por acidificação, deve apresentar pH inferior a 6,0 e deriva da produção de queijos tipo Cottage e da produção de caseína comercial (BRASIL, 2012; MILLER et al., 2002).

Em virtude das altas concentrações das substâncias orgânicas, principalmente lactose e proteínas, o soro de leite apresenta elevado poder poluente. A demanda bioquímica de oxigênio (DBO) do soro varia entre 30 e 50 g L⁻¹ e sua demanda química de oxigênio (DQO) está entre 60 e 80 g L⁻¹, dependendo do processo empregado para a fabricação do queijo (DOMINGUES et al., 1999; SISO, 1996). Em função disso, a carga poluente do soro de leite pode ser até 100 vezes maior que a carga de um esgoto doméstico. Neste sentido, o não tratamento do soro ou a realização deste de forma inadequada gera grande problema ambiental quando incorporado nas águas residuais dos laticínios e descartado nos corpos hídricos ou no solo como adubo (ANTUNES, 2003; RALPH, 1982).

Na tentativa de minimizar o impacto ambiental, bem como de aumentar o aproveitamento no setor alimentício e evitar o desperdício nutricional e financeiro, diferentes alternativas industriais vêm sendo empregadas. Pode-se mencionar, por exemplo, a utilização do soro de leite em sua forma original para produção de bebidas lácteas. Quando concentrado, pode-se utilizar de sua rica composição e

importante valor funcional para obtenção de diversos produtos de elevado valor nutricional, como bebidas proteicas, produtos cárneos e de panificação, sobremesas, alimentos infantis e produtos lácteos em geral, como iogurtes, queijos e sorvetes (BYLUND, 2003; MILLER et al., 2002; USDEC, 2018).

Sabe-se que para a realização do tratamento adequado do soro de leite e aproveitamento de seus nutrientes da melhor forma possível, se faz necessário o conhecimento de sua composição, entendimento do seu valor nutricional e de suas propriedades funcionais, como será abordado a seguir.

1.1.1 Composição do soro de leite

O soro de leite possui composição nutricional que varia conforme a composição química do leite, a qual por sua vez depende de fatores climáticos, alimentação, idade, espécie e raça do animal. A composição do soro também difere conforme o tipo de coagulação empregado na produção de queijo e é influenciada pelo tipo de tratamento térmico realizado no leite (ANTUNES, 2003; LUCAS et al., 2006).

De acordo com Wong et al. (1999), o soro doce predomina, representando cerca de 90% do total produzido. Mas, para efeito de comparação, a composição dos dois tipos de soro está apresentada na Tabela 1, exibida a seguir.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO SORO DE LEITE DOCE E ÁCIDO, DE ORIGEM BOVINA.

Componente	Doce (%)	Ácido (%)
Água	93,0 – 94,0	93,0 – 95,0
Proteína	0,8 – 1,0	0,7 – 1,0
Lactose	4,6 – 5,0	4,2 – 4,4
Lipídeos	0,2 – 0,5	0,05 – 0,1
Minerais	0,5 – 0,7	0,7 – 0,8
Ácido láctico	0,05 – 0,2	0,5 – 0,8

Fonte: Adaptado de GANJU e GOGATE (2017), NISHANTHI; VASILJEVIC e CHANDRAPALA (2017); USDA (2018).

Observa-se na tabela acima que a concentração de proteínas é semelhante em ambos os tipos de soro, mas eles apresentam alguma diferença na concentração

de lactose, minerais e ácido láctico. Enquanto o soro doce é mais rico em lactose, no soro ácido esta é parcialmente convertida em ácido láctico durante a formação da coalhada. E devido ao pH mais baixo do soro ácido, há solubilização do complexo cálcio-fósforo presente nas micelas de caseína, o que faz com que este tipo de soro contenha maior concentração destes dois minerais (WONG et al., 1999).

O soro contém ainda muitos dos minerais e vitaminas solúveis presentes no leite, como cálcio, potássio, fósforo, sódio, vitaminas do complexo B, vitamina A, vitamina C e outras como apresentado na Tabela 2 (MILLER et al., 2002).

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DE VITAMINAS E MINERAIS DO SORO DE LEITE DE ORIGEM BOVINA.

Componente	Doce	Ácido
Vitaminas*		
Vitamina A (IU)	44,00	107,00
Vitamina C (mg)	1,50	0,30
Vitamina E (mg)	0,03	0,05
Tiamina (B1) (mg)	0,50	0,50
Riboflavina (B2) (mg)	2,20	11,80
Piridoxina (B6) (mg)	0,60	0,60
Vitamina B12 (mcg)	2,40	2,50
Ácido Pantotênico (mg)	5,60	1,80
Niacina (mg)	1,30	1,00
Folato (mcg)	11,60	0,03
Minerais*		
Cálcio (mg)	796,00	2279,00
Fósforo (mg)	931,70	1516,00
Sódio (mg)	1079,00	1022,00
Potássio (mg)	2080,00	1885,00
Magnésio (mg)	176,00	247,00
Zinco (mg)	1,97	7,70
Ferro (mg)	0,90	1,40
Cobre (mg)	0,07	5,30
Selênio (mcg)	0,06	27,30

*Valores por 100g de soro seco.

Fonte: USDA (2018).

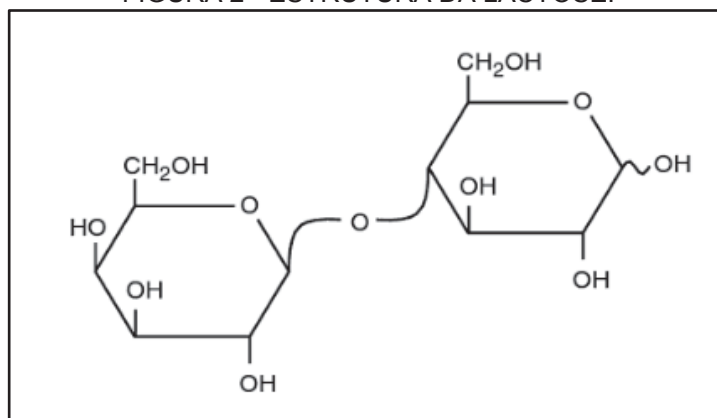
Os minerais e vitaminas presentes no soro de leite são componentes valiosos nutricionalmente, o que torna importante o aproveitamento destes constituintes para sua incorporação em outros produtos. Como, por exemplo, a fortificação de alimentos com a adição de cálcio (MATTILA-SANDHOLM; SAARELA, 2003).

Neste aspecto, de recuperação e aproveitamento dos componentes do soro, a lactose e as proteínas ganham destaque por estarem presentes em maiores quantidades no extrato seco do soro e apresentarem grande importância nos processos de separação. Logo, estes dois elementos serão tratados com maior ênfase a seguir.

1.1.2 Lactose

A lactose (4-o- β -galactopiranosil-D-glicopiranoose), também conhecida como “açúcar do leite”, é um carboidrato formado na glândula mamária, a partir da glicose do sangue. Apresenta-se no leite como o componente mais abundante e é considerada como a fonte primária para o desenvolvimento de mamíferos. A lactose é um dissacarídeo formado por D-glicose e D-galactose unidos por uma ligação β -1,4-glicosídica, como ilustra a Figura 2 (DEMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

FIGURA 2 - ESTRUTURA DA LACTOSE.



Fonte: DEMODARAN; PARKIN; FENNEMA (2010).

O poder edulcorante da lactose é baixo, considerado como uma qualidade dietética, pois é seis vezes menor que o da sacarose. Por isso, pode ser adicionada a alimentos em que se deseja redução do sabor doce, como sopas, bebidas instantâneas e produtos cárneos. Além disso, possui elevado valor nutritivo, favorece a retenção de Ca, não forma placas dentárias e nem tem efeitos cancerígenos (ORDÓÑEZ, 2005).

No entanto, a lactose apresenta a característica de não ser facilmente digerida por parte da população humana, pois para ser absorvida precisa ser hidrolisada pela enzima lactase, resultando nos monossacarídeos glicose e galactose. Como algumas pessoas não possuem esta enzima ou apresentam redução da atividade enzimática, o organismo é incapaz de digerir este açúcar, condição conhecida como intolerância à lactose (DEMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A lactose não absorvida permanece no intestino grosso, servindo de substrato para as bactérias intestinais que a utilizam para seu crescimento, resultando em sintomas como flatulência, diarreia, inchaço e cólica. A incidência da intolerância a lactose é fortemente influenciada pela questão étnica, sendo que asiáticos e populações de origem negra ou mulata apresentam maior grau de intolerância do que populações brancas (KUMAR et al., 2015; VRESE et al., 2001).

Sendo assim, além de promover a recuperação da lactose do soro do leite para aproveitamento na formulação de outros produtos, é interessante a realização da hidrólise deste dissacarídeo, possibilitando assim seu consumo por pessoas que possuem esta intolerância (VASILEVA et al., 2016).

Os produtos obtidos da hidrólise da lactose possuem poder edulcorante superior à lactose, o que é bastante útil para outros derivados lácteos, produtos de confeitaria e indústrias de bebidas. Por apresentar poder adoçante elevado, representa economia de sacarose, já que os produtos elaborados a partir dos hidrolisados da lactose requerem pouca ou nenhuma adição da mesma. Além de proporcionar doçura aos produtos, a hidrólise da lactose também confere cremosidade e previne a cristalização da lactose na produção de sorvete, doce de leite e demais derivados lácteos (OBÓN et al., 2000; VASILEVA et al., 2016).

Ademais, a lactose na forma hidrolisada viabiliza sua aplicação como substrato durante processos fermentativos para obtenção de diversos produtos, entre os quais se destaca o etanol (BENIWAL et al., 2018; TOMASZEWSKA; BIAŁOŃCZYK, 2016).

1.1.3 Proteínas do soro

As proteínas do soro são definidas como aquelas que permanecem no soro do leite após a coagulação das caseínas. Elas representam cerca de 20% do nitrogênio proteico encontrado no leite, apresentam estrutura globular e possuem importante valor nutricional, propriedades bioativas e características funcionais, além de excelente digestibilidade quando comparadas com outras proteínas, por isso são consideradas como o elemento mais valioso do soro de leite (ANTUNES, 2003).

A qualidade nutricional das proteínas do soro é amplamente conhecida, possuindo valor biológico (VB) de 104, o qual é considerado superior ao ovo, soja e proteína da carne, que possuem VB de 100, 74 e 88, respectivamente. Segundo Smithers (2015) e Hoffman e Falvo (2004), o valor biológico é uma forma de medir a qualidade de uma proteína, pois está relacionado à capacidade do organismo de digerir, absorver e utilizar seus aminoácidos para a síntese de novas proteínas.

As principais proteínas do soro são β -lactoglobulina, α -lactalbumina, albumina de soro bovino, imunoglobulinas, glicomacropéptídeos, protease-peptona e algumas outras minoritárias, como apresentado pela Tabela 3. Nesta mesma tabela, observa-se que as proteínas β -lactoglobulina e α -lactoalbumina são as frações em maior concentração, juntas representam cerca 70% das proteínas do soro.

A β -lactoglobulina é a fração proteica mais abundante no soro de leite, além de ser a principal proteína do soro de leite bovino, ovino e caprino. E, justamente por estar presente no leite bovino em abundância, as propriedades relacionadas aos concentrados proteicos do soro são, na verdade, as propriedades da β -Lg. A molécula de β -Lg possui 162 aminoácidos, é sensível a pH e temperaturas elevadas (ANTUNES, 2003; EDWARDS, 2009; YADA, 2004).

A segunda fração proteica de maior concentração no soro de leite é representada pela α -lactoalbumina. Esta é uma molécula globular, praticamente esférica, formada por 123 aminoácidos e considerada a única proteína do soro capaz de se ligar ao cálcio, o que contribui para sua absorção. Na composição da α -La estão presentes diversos aminoácidos essenciais, como o triptofano, que é precursor da vitamina niacina, a qual desempenha importante função no metabolismo celular. E por apresentar perfil de aminoácidos semelhante ao leite humano, a α -La é recomendada na formulação de alimentos infantis. Ademais, a α -

La é uma proteína que apresenta fácil e rápida digestão (KINSELLA; WHITEHEAD, 1989; ZIEGLER; SGARBIERI, 2009).

TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE BOVINO.

Proteína	Ponto Isoelétrico	Massa Molecular (kDa)	Conteúdo (%)	Propriedades	Referência
β -lactoglobulina (β -Lg)	5,2	18,4	30,0 – 55,0	Atividade anti-hipertensiva, anticarcinogênica, intensificadora de apetite, gelificante e espumante	Cheung et al. (2015); Korhonen (2009)
α -lactoalbumina (α -La)	4,5 – 4,8	14,2	20,0 – 25,0	Anti-hipertensiva, atividade antioxidante, emulsificante e espumante	Conway et al. (2013); Shi et al. (2012)
Albumina do soro bovino (BSA)	4,7 – 4,9	66,5	5,0 – 10,0	Atividade anticarcinogênica e antioxidante. Propriedades espumantes e gelificantes	Madureira et al. (2007); Mollea et al. (2013)
Imunoglobulina (Ig)	5,5 – 8,3	150,0 – 1000,0	10,0	Anticolesterol, propriedades antimicrobianas e antivirais	Mollea (2013)
Protease-peptona	3,7	4,0 – 22,0	12,0	Melhora a produção de anticorpos	Krissansen (2007); Sugahara et al. (2005)
Glico-macropéptido (GMP)	4,3 – 4,6	6,8	10,0 – 15,0	Propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras. Inibe a colite e melhora o desenvolvimento cognitivo em animais	Krissansen (2007)
Lactoferrina (Lf)	7,0 – 9,0	78,0	1,0 – 2,0	Potencial antiobesidade, atividade anti-inflamatória e antimicrobiana	Hernández-Ledesma et al. (2011); Salami et al. (2010); Shi; Finckenberg et al. (2012)
Lactoperoxidase (Lp)	9,5	89,0	0,5	Atividades bacteriostáticas, bactericidas e antifúngicas	Seifu (2005)

Fonte: Adaptado de RYAN e WALSH (2016), AGUERO et al. (2017); COWAN e RITCHIE (2007).

O importante valor nutricional do soro é devido ao seu elevado teor de aminoácidos essenciais como, por exemplo, histidina, lisina, metionina, triptofano e fenilalanina, que são aqueles não sintetizados pelo organismo e que precisam ser

obtidos pela alimentação. Anthony et al. (2001) e Ha e Zemel (2003) destacam a importância de leucina, um aminoácido que desempenha papel importante no metabolismo proteico e na síntese de proteína muscular. De acordo com Antunes (2003), a histidina é um aminoácido essencial para crianças e Parodi (2007) comenta que a presença de aminoácidos que contém enxofre, como a cistina e metionina, conferem às proteínas do soro o potencial anticancerígeno.

Além das características nutricionais e de serem substâncias potencialmente benéficas à saúde, as proteínas do soro apresentam propriedades funcionais tecnológicas, como apresentado na Tabela 3 e Tabela 4. Estas propriedades as tornam importantes para a indústria de alimentos, especialmente quando aplicadas em produtos onde as características sensoriais, como textura, são fundamentais para aceitação pelo consumidor (ARAÚJO, 2011; SCHONG; FAMELART, 2017).

Dentre estas propriedades, as que se destacam são: solubilidade, gelificação, formação de espuma e emulsificação. A β -lactoglobulina, por exemplo, apresenta excelentes propriedades gelatinizantes, enquanto que a α -lactoalbumina possui capacidade de formar espuma similar à clara do ovo (ANTUNES, 2003; BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011).

1.1.3.1 Separação e aproveitamento das proteínas do soro de leite

Apesar dos benefícios para a saúde e das funcionalidades para a indústria atribuídas às proteínas, há uma parcela da população que sofre de uma reação adversa após consumir leite de vaca, conhecida como alergia à proteína do leite de vaca (APLV). Neste aspecto, a obtenção de soro de leite desproteínizado é uma alternativa vantajosa, pois este pode ser incorporado na formulação de alimentos destinados a este nicho de mercado que não pode consumir proteínas lácteas (HOCHWALLNER et al., 2014; MANTI et al., 2017).

Em contrapartida, as proteínas separadas do soro podem ser inseridas em produtos nos quais suas propriedades funcionais sejam desejadas. Neste sentido, o aproveitamento das proteínas do soro, componentes mais valiosos deste resíduo, ganhou interesse e deu origem aos produtos proteicos de soro concentrados e isolados (ONWULATA; HUTH, 2008).

O concentrado proteico de soro (*whey protein concentrate – WPC*) é o produto obtido pela remoção de constituintes não proteicos do soro de forma que o produto final seco possua teor proteico entre 35% e 80%. Enquanto que o isolado proteico de soro (*whey protein isolate – WPI*) é a forma comercial mais pura das proteínas do soro e contém entre 80 e 95% de proteína (BRANS et al., 2004).

Conforme Renner e Abd El-Salam (1991), as aplicações de WPC e WPI na indústria de alimentos ocorrem devido aos vários benefícios desses produtos, como: alto teor de proteína e aminoácidos essenciais; baixas calorias, gorduras e teor de sódio; ausência de patógenos, compostos tóxicos e antinutricionais; boa capacidade emulsificante; compatibilidade com outros ingredientes e a percepção de produto “natural”. Além disso, os concentrados e isolados proteicos se destacam pela funcionalidade que podem conferir aos alimentos. Assim, contemplam ampla gama de produtos, como apresentado pela Tabela 4.

TABELA 4 - PROPRIEDADES FUNCIONAIS TECNOLÓGICAS CONFERIDAS AOS ALIMENTOS PELOS CONCENTRADOS PROTEICOS.

Propriedade	Aplicações
Emulsificação	Molhos para saladas, sopas com baixo teor de gordura, queijos fundidos
Formação de espuma	Glacê, <i>chantilly</i> , chocolates aerados
Solubilidade	Bebidas fortificadas com proteínas, bebidas isotônicas, bebidas para crianças, sucos, iogurtes e bebidas substitutas de refeições
Elasticidade	Bolo, <i>cookies</i> , <i>brownie</i> , pães, massas, <i>waffles</i> , biscoitos
Gelatinização	Iogurte, sorvete
Viscosidade	Chocolates, glacê, <i>marshmallow</i>
Absorção de água e gordura	Salsicha, hambúrguer, presunto, <i>nuggets</i> , embutidos

Fonte: Adaptado de USDEC (2018).

A utilização das proteínas do soro como ingredientes em produtos alimentícios vem aumentando, conforme evoluem as tecnologias para produção de WPC e WPI nas indústrias. Segundo Gillies (1974), inicialmente as indústrias aplicavam diferentes métodos de concentração e secagem em tambor rotativo para obtenção do soro em pó, o que além de apresentar alto custo, impossibilitava algumas aplicações pela elevada quantidade de lactose e sua natureza higroscópica. Após, desenvolveram-se métodos que aplicavam evaporadores de

múltiplos estágios e, posteriormente, processamentos de soro de leite por *spray dryer*.

Contudo, os métodos convencionais de processamento do soro de leite, evaporação e secagem, não contribuem para a recuperação dos constituintes valiosos do soro, sendo utilizados apenas com a finalidade de remoção de parte de água para redução de volume e melhor conservação. Além disso, os métodos que empregam altas temperaturas podem provocar a desnaturação das proteínas, alterações de cor, sabor e perdas nutricionais (WINGERD, 1971; YORGUN et al., 2008).

Neste sentido, os processos de separação por membranas podem ser aplicados para o processamento do soro de leite e fracionamento dos seus componentes, como proteínas do soro e lactose, sem causar prejuízos à qualidade dos produtos obtidos e com capacidade de manter as propriedades tecnofuncionais de constituintes como as proteínas (BRANS et al., 2004).

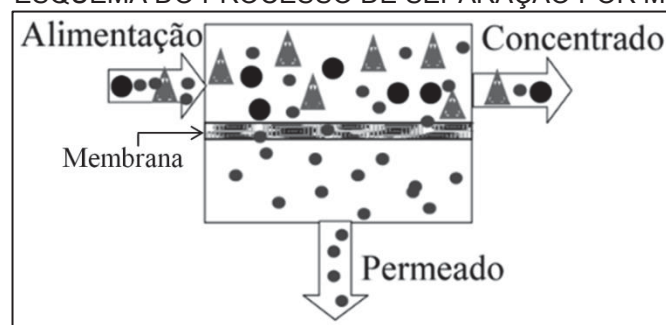
1.2 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS (PSM)

Diversos produtos da indústria química, alimentícia e farmacêutica exigem em seu processo produtivo o emprego de operações com a finalidade de separar, concentrar e purificar espécies químicas que fazem parte de sua composição. Como processos clássicos aplicados com estas finalidades, cita-se: destilação, troca iônica, filtração, centrifugação e extração por solvente. Mas, a técnica denominada de separação por membranas, que também pode ser empregada com essas finalidades, vem sendo amplamente estudada e aplicada nos últimos anos, se mostrando bastante eficiente e promissora (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

O processo de separação por membranas (PSM) consiste na separação de dois ou mais componentes através de uma membrana que se comporta como uma barreira semipermeável. A membrana atua de forma seletiva e restringe a passagem de uma ou mais espécies químicas, de forma parcial ou total. Neste processo, permite-se separar líquidos dissolvidos e também misturas de gases (CHERYAN, 1998).

Os componentes da solução de alimentação que ficam retidos na membrana dão origem à corrente de concentrado (retentado), enquanto que os que permeiam a membrana formam a corrente denominada de permeado, como ilustrado na Figura 3 (SEADER; HENLEY, 2006). Considera-se importante ressaltar que quando o objetivo é a concentração de determinada espécie, geralmente o retentado será o produto desejado. Entretanto, no caso de purificação, tanto o retentado quanto o permeado podem ser o produto pretendido, dependendo das impurezas que devem ser removidas.

FIGURA 3 - ESQUEMA DO PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS.



Fonte: Adaptado de HABERT et al. (2006)

Os processos que empregam membranas possuem algumas vantagens em comparação a outros processos de separação, dentre elas estão aquelas citadas por Mulder (1996), como:

- Realização da separação de forma contínua;
- Consumo de energia geralmente baixo;
- Podem ser combinados facilmente com outros processos de separação;
- Emprego de condições de processo moderadas;
- Possibilidade de operar à temperatura ambiente;
- Alta seletividade;
- Não são necessários aditivos.

1.2.1 Tipos de membranas e processos

Nos PSM, podem ser utilizados diferentes tipos de membranas, conforme as aplicações desejadas. Com relação à natureza, as membranas podem ser naturais ou sintéticas. Quanto à morfologia, podem ser porosas ou densas, sendo que ambas ainda podem ser classificadas em isotrópicas ou anisotrópicas, o que significa que podem apresentar ou não as mesmas características ao longo de sua espessura. A distribuição de tamanho de poros, porosidade superficial e espessura são parâmetros importantes no caso de se trabalhar com membranas porosas. No caso das membranas densas, os parâmetros mais relevantes são a espessura do filme polimérico empregado e as características físico-químicas tanto do polímero utilizado quanto das substâncias que se deseja separar (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

A configuração da membrana também pode variar entre os tipos fibra oca, placa-quadro, espiral e tubular. As membranas de fibra oca apresentam alta densidade de empacotamento, ou seja, maior área de membrana por unidade de volume, além de baixo custo e resistência à alta pressão. No entanto, são mais sensíveis ao entupimento. Para soluções com altos níveis de sólidos suspensos geralmente se utiliza membranas tubulares, pois são mais fáceis de limpar, porém elas apresentam baixa área por unidade de volume. As membranas placa-quadro possuem flexibilidade para controle da velocidade do fluxo e pressão, têm custo e densidade de empacotamento moderados e apresentam facilidade para limpeza e substituição. A desvantagem deste tipo de membrana é a quantidade de mão de obra requerida para limpeza manual ou troca de membranas. A possibilidade de instalar grande área de membrana a baixo custo é a vantagem das membranas em espiral, que possuem *design* extremamente compacto e alto fluxo. Em contrapartida, são sensíveis a sólidos suspensos, possuem tendência ao entupimento e sua limpeza é difícil (SEADER; HENLEY, 2006; TAMIME, 2013).

A separação através da membrana ocorre devido às diferenças de tamanho, forma ou estrutura química dos componentes de uma mistura. No caso da diferença de tamanho entre moléculas, podem-se citar as clássicas operações de ultrafiltração, microfiltração e nanofiltração, como apresentado pela Tabela 5. Mas, para que o processo de separação ocorra através de uma membrana, deve existir

uma força motriz agindo sobre a mesma. Os PSM comerciais utilizam como força motriz o gradiente de potencial químico ou o gradiente de potencial elétrico (ΔE), sendo que o gradiente de potencial químico pode ser expresso em termos do gradiente de pressão (ΔP) e de concentração (ΔC) (MULDER, 1996).

TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS DOS DIFERENTES PSM.

Processo	Força motriz	Retentado	Permeado	Aplicações
Microfiltração (MF)	ΔP (0,5 – 2 atm)	Sólidos suspensos, bactérias	Sólidos dissolvidos e água	Diminuição da carga microbiana; Clarificação de vinhos e cervejas
Ultrafiltração (UF)	ΔP (1 – 7 atm)	Coloides, macromoléculas	Moléculas menores, sais solúveis e água	Fracionamento/concentração de proteínas e outras macromoléculas; Produção de queijos
Nanofiltração (NF)	ΔP (5 – 25 atm)	Moléculas de massa molecular média	Água, sais e moléculas de baixa massa molar	Purificação de enzimas; Tratamento de efluentes
Osmose Inversa (OI)	ΔP (15 – 80 atm)	Todos os solutos	Água	Dessalinização de águas; Concentração de suco de frutas; Tratamento de efluentes
Diálise (D)	ΔC	Macromoléculas	Moléculas menores, íons e água	Hemodiálise; Rim artificial
Eletrodiálise (ED)	ΔE	Macromoléculas e compostos não iônicos	Íons	Dessalinização; Purificação de águas
Permeação de Gases (PG)	ΔP e ΔC	Gás menos permeável	Gás mais permeável	Recuperação de hidrogênio; Fracionamento do ar
Destilação por membranas (DM)	Pressão de vapor	Macromoléculas e sólidos suspensos	Moléculas menores, sais solúveis e água	Dessalinização; Tratamento de efluentes; Concentração de soluções aquosas
Pervaporação (PV)	Pressão de vapor	Moléculas não voláteis e menos permeáveis	Compostos voláteis e água	Desidratação de solventes orgânicos e álcoois

ΔP : gradiente de pressão; ΔC : gradiente de concentração; ΔE : gradiente de potencial elétrico.
Fonte: Adaptado de CHERYAN (1998); HABERT; BORGES; NOBREGA (2006); MULDER (1996).

1.2.2 Fenômenos que limitam o fluxo de permeado

A principal desvantagem dos processos de separação por membranas é a diminuição do fluxo de permeado e, conseqüentemente, redução na produtividade no decorrer do tempo de processo. Os fenômenos responsáveis pela redução da

permeação são polarização por concentração, camada polarizada ou torta filtrante e *fouling* (USHIKUBO; WATANABE; VIOTTO, 2006).

A polarização por concentração consiste no movimento difusivo do soluto no sentido de retornar ao seio da solução, ocasionado pelo aumento da concentração das espécies retidas próximo à superfície da membrana. Este fenômeno tende a aumentar a resistência à transferência de massa através da membrana, provocando queda no fluxo do permeado logo no início do processo. Por ser um fenômeno inerente aos processos de transporte seletivo, a polarização por concentração é reversível ao cessar a operação do sistema (MULDER, 1996). Quando a concentração do soluto na interface membrana/solução aumenta de tal maneira que ocorre um depósito na superfície da membrana, tem-se o fenômeno de camada polarizada ou formação da torta filtrante (USHIKUBO; WATANABE; VIOTTO, 2006).

O *fouling* pode ser definido como o acúmulo de material indesejável sobre a superfície da membrana e é causado por sais inorgânicos, partículas orgânicas, material biológico e por degradação da membrana (WARSINGER et al., 2015). Dentre os fatores que afetam o *fouling*, estão: as propriedades físico-químicas e a morfologia da membrana, que incluem a natureza da membrana, a distribuição e o tamanho de poros; as propriedades físico-químicas da solução, como a concentração dos componentes presentes, o pH e o tamanho das moléculas; e os parâmetros de operação, como a pressão, temperatura e velocidade (REZAEI et al., 2011).

Para superar o declínio no fluxo ao longo do processo e tornar os PSM mais vantajosos e competitivos, algumas medidas podem ser adotadas. A limpeza regular das membranas, a utilização de membranas com baixa tendência à incrustação e a escolha correta das condições de processo, podem minimizar os efeitos negativos e evitar a perda de produtividade (PEINEMANN; NUNES; GIORNO, 2010).

1.2.3 Ultrafiltração

O processo de UF, intermediário entre a MF e a NF, trabalha com tamanho de poros da membrana entre 0,01 e 0,1 μm e pressão de cerca de 100 a 500 kPa, por

isso é geralmente empregado com a finalidade de reter macromoléculas e colóides presentes em solução (CHERYAN, 1998; MULDER, 1996).

A ultrafiltração possui ampla aplicação na indústria de alimentos, farmacêutica, química, têxtil e metalúrgica. De acordo com Seader e Henley (2006) e Mulder (1996), dentre as aplicações na indústria de alimentos, pode-se citar:

- Clarificação de sucos e bebidas alcoólicas;
- Concentração de produtos de ovos;
- Concentração de leite e fabricação de queijo;
- Recuperação de proteínas lácteas;
- Recuperação de amido de batata;
- Concentração de enzimas e outras biomoléculas.

Vários pesquisadores vêm aplicando o processo de ultrafiltração no processamento do soro de leite, como pode ser visto na Tabela 6. A maioria dos estudos tem investigado a separação, concentração e isolamento das proteínas do soro, seja com soluções sintéticas que simulam soro real ou com soro fresco obtido de laticínios.

TABELA 6 - ESTUDOS COM PROCESSO DE UF APLICADO AO SORO DE LEITE.

Objetivo	Matéria-prima	Membrana utilizada	Referência
Avaliar a eficiência da limpeza de membranas de UF utilizando um biosurfatante ramnolipídico	Soro de leite	Módulo de CF com membrana PES; área = 30 cm ² ; espessura = 100 µm	Aghajani et al. (2018)
Desenvolver uma membrana de alto fluxo com propriedades hidrofílicas e <i>antifouling</i>	Solução de BSA	Membrana de blenda Mg-Al NLDH/PVDF; área = 19,6 cm ²	Arefi-Oskoui et al. (2016)
Estudar a resistência ao <i>fouling</i> e limpeza <i>clean in place</i> (CIP) de membranas de UF	Solução de WPC	Módulo placa-quatro; área = 0,0336 m ²	Berg et al. (2015, 2014)
Investigar a redução de Aflatoxina M1 em amostras de soro por UF	Soro de queijo ricotta e soro desproteínizado	Módulo de membrana Amicon Ultracel; MMC = 10 kDa	Cattaneo et al. (2013)

Continuação da Tabela 6:

Estudar a influência das propriedades de membranas no desempenho da UF	Leite e soro de leite fresco	Duas membranas folha-plana de PES e PVDF (50 kDa); área = 42 cm ² ;	Chamberland et al. (2017)
Avaliar as características de permeação de membrana, modelar a UF e determinar as condições ótimas de operação	Soro de queijo ovino	Três membranas comerciais de UF	Macedo et al. (2011)
Otimizar a recuperação de proteínas de soro fermentado	Soro de leite fermentado	Módulo espiral com membrana de CR; MMC = 1 e 10 kDa; áreas = 0,093 e 0,557 m ²	Yadav et al. (2016)
Estudar a padronização e armazenamento de WPC	Soro de leite bubalino fresco	Planta de UF com 5 estágios de filtração	Rathour et al. (2017)
Estudar os mecanismos de <i>fouling</i> por modelos matemáticos usando várias condições operacionais	Solução de soro de leite	Módulo de CF com membrana blenda PES/copolímero; área = 40 cm ²	Torkamanzadeh et al. (2016)
Investigar a influência de condições operacionais em UF combinada com DF para produção de pó enriquecido em proteínas Lf e IgG	Soro de queijo <i>feta</i>	Módulo espiral com membrana PVDF (MMC = 75 kDa; área 0,5574 m ²) e conjunto de 18 membranas cilíndricas PVDF (MMC = 100 kDa; área 0,88 m ²)	Tsakali et al. (2015)
Separação de α -La e β -Lg por um sistema contínuo em UF cascata de três estágios	Solução de WPI	Módulo de UF com fluxo tangencial; área = 66 cm ² ; MMC = 30 e 60 kDa	Patil et al. (2014)
Concentração e purificação de proteínas do soro usando DF descontínua	Solução de soro em pó	Membrana de PES em módulo espiral; MMC = 10 kDa; área = 0,28 m ²	Baldasso, Barros e Tessaro (2011)
Estudar o desempenho do fluxo de UF para produção de WPC	Soro ácido	Módulo de CF com membrana PES; área = 0,093 m ² ; MMC = 10 e 30 kDa	Konrad et al. (2012)
Avaliar a eficiência da limpeza química de membranas de UF	Solução de WPI	Membrana de PES ; MMC = 30 kDa; área = 15,5 cm ²	Norazman et al. (2013)
Separar e recuperar as proteínas e açúcares com dois passos sequenciais de UF com diferentes membranas	Soro de queijo <i>Halloumi</i> (mistura de leite caprino e ovino)	Membranas de PS (20, 50 e 100 kDa); PES (2 kDa); área = 0,1344 m ² (4 folhas de 0,0336 m ²)	Galanakis et al. (2014)
Desenvolver método em cascata com diferentes membranas para separação de frações individuais de proteína e lactose	Soro fresco de caseína	Módulo de CF; membrana PES; área = 0,02 m ²	Nath et al. (2014)
Propor um procedimento alternativo e inovador para limpeza de membranas com ultrassom	Solução de WPC	Membrana folha plana de PES com MMC = 5 kDa; Membrana hidrofílica de 30 kDa; área = 100 cm ²	Luján-Facundo et al. (2017)

BSA: albumina do soro bovino; WPC: concentrado proteico de soro; WPI: isolado proteico de soro; CF: fluxo cruzado (*cross-flow*); DF: diafiltração; MMC: massa molar de corte; NLDH: hidróxido duplo nanolaminado; CR: celulose regenerada; PES: polietersulfona; PVDF: fluoreto de polivinilideno; PS: polissulfona.

Baldasso, Barros e Tessaro (2011), por exemplo, estudaram a concentração e purificação das proteínas do soro de leite pelo processo de UF associado à DF. Os autores utilizaram soro de leite reconstituído, membrana de polietersulfona em módulo espiral e obtiveram concentração máxima de proteína de 71%.

No estudo realizado por Arunkumar, Molitor e Etzel (2016), empregou-se a UF com duas diferentes configurações de membrana, placa plana e em espiral, carregadas negativamente, para concentração das proteínas do soro de leite. Obtiveram-se resultados satisfatórios para ambas as membranas, com retenção das proteínas do soro acima de 98%.

Corbatón-Báguena, Álvarez-Blanco e Vincent-Vela (2015) utilizaram diferentes soluções para simular o soro de leite, como a albumina do soro bovino e o WPC. Os autores testaram membranas com diferentes massas molares de corte e aplicaram vários modelos para prever o fluxo de permeado. Neste estudo, observou-se que a membrana de 30 kDa apresentou o menor declínio no fluxo permeado, possivelmente devido a uma combinação dos fatores característicos desta membrana, como alta hidrofiliabilidade e baixa rugosidade superficial. Os resultados da modelagem verificaram que os modelos de bloqueio completo dos poros e torta filtrante foram os mecanismos predominantes.

Estudos de *fouling* são cruciais para a produção de WPC ou WPI, porque quase todas as proteínas são retidas, e a formação de torta e gelificação das proteínas na superfície da membrana ocorrem facilmente. Por essa razão, a seleção do tipo apropriado de membrana e métodos para controlar a incrustação é extremamente importante. Ainda, a obtenção de máxima seletividade no processo de fracionamento tem sido buscada por diversos pesquisadores.

Além da utilização de soluções modelo e soros de leite derivados da produção de queijo bovino, o soro derivado do leite de outros animais também tem sido investigado. Galanakis et al. (2014), por exemplo, avaliaram o processo de UF para a recuperação de proteínas e açúcares a partir do soro obtido da produção de queijo *Halloumi*, o qual é obtido a partir de uma mistura de leite de ovelha e cabra. Lech, Niesobska e Trusek-Holownia (2016) investigaram o fracionamento de proteínas presentes no soro do leite de cabra utilizando o processo UF para concentração com subsequente separação por cromatografia.

Recentemente, abordagens que integram diferentes processos de separação têm sido aplicadas com frequência no tratamento e recuperação de componentes do

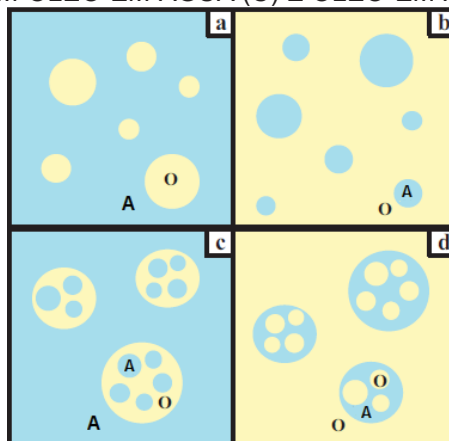
soro. Este tipo de metodologia foi estudado por Das et al. (2016) para a recuperação de proteínas e lactose de resíduos lácteos. Os autores utilizaram diferentes PSMs, incluindo micro, ultra e nanofiltração, juntamente com centrifugação e liofilização, e observaram como resultado a recuperação de 80% de proteínas pelo processo de ultrafiltração e 90% de lactose empregando a técnica de nanofiltração.

Porém, apesar dos estudos de recuperação das proteínas e da lactose presentes do soro do leite terem apresentado bons resultados e, inclusive, já existirem processos industriais que empregam este procedimento e comercializam seus produtos, o descarte do soro de leite de forma inadequada ainda ocorre, bem como a subutilização dos seus componentes. Segundo Baldasso, Barros e Tessaro (2011), apesar dos elevados volumes de soro de leite gerados, apenas 50% são processados. Além disso, a utilização da lactose concentrada, obtida pelo processo de nanofiltração, não atende a demanda da enorme parcela da população que apresenta intolerância à lactose, para a qual o emprego na forma hidrolisada seria mais interessante.

1.3 EMULSÕES

As emulsões são definidas como sistemas compostos por dois líquidos imiscíveis, em que um dos líquidos se encontra disperso no outro na forma de gotículas. Normalmente, as emulsões são constituídas por uma fase aquosa e a outra oleosa, podendo ser classificadas em emulsões simples ou múltiplas, Figura 4. As emulsões simples podem ser do tipo óleo-em-água (O/A), quando a fase dispersa é o óleo e a fase dispersante (contínua) é a aquosa, ou emulsões água-em-óleo (A/O), quando gotículas de água estão dispersas na fase oleosa. Nas emulsões múltiplas, também denominadas “emulsões de emulsões”, as gotículas de óleo podem estar dispersas em gotículas de água, que por sua vez estão dispersas em óleo, formando emulsões óleo-em-água-em-óleo (O/A/O) ou ainda podem ser emulsões água-em-óleo-em-água (A/O/A) (MORRISON; ROSS, 2002; SCHRAMM, 2005).

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE EMULSÕES ÓLEO-EM-ÁGUA (A), ÁGUA-EM-ÓLEO (B), ÁGUA-EM-ÓLEO-EM-ÁGUA (C) E ÓLEO-EM-ÁGUA-EM-ÓLEO (D).



Fonte: BOUYER et al. (2012).

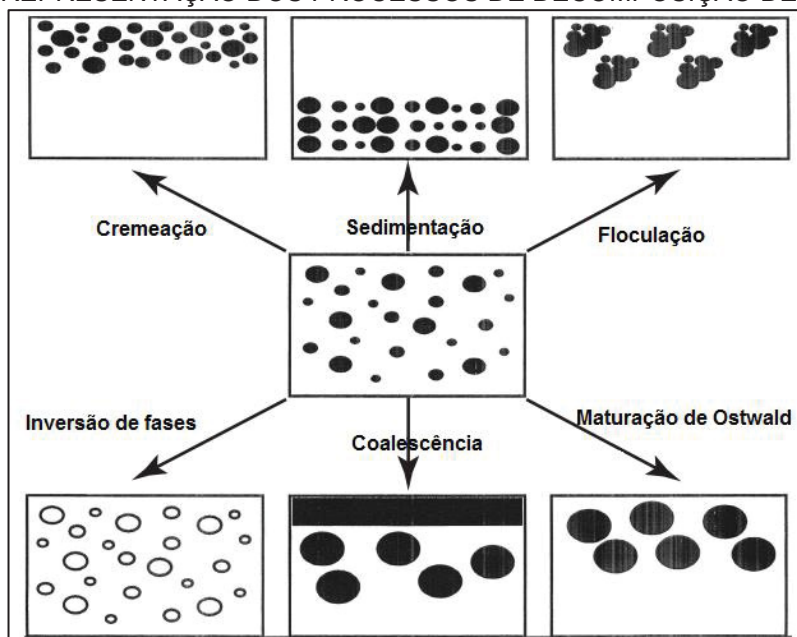
O processo de formação das emulsões ocorre pela dispersão de um dos fluidos imiscíveis no outro, com constante homogeneização, criando uma interface (McCLEMENTS, 1999). Para isto, vários equipamentos podem ser utilizados, como misturadores de alta velocidade (Ultraturrex), misturadores estáticos, moinhos coloidais e agitadores e homogeneizadores de alta pressão (TADROS, 2013). Em geral, a homogeneização à alta pressão é a mais utilizada para a produção de emulsões lácteas e de demais alimentos. Esta técnica de emulsificação consiste em forçar os dois fluidos ou uma pré-mistura a passar através de uma válvula para uma câmara de mistura, sob o efeito de uma pressão muito alta. A técnica por membranas também tem sido aplicada no preparo de emulsões e se baseia em forçar a passagem de um fluido por uma membrana, formando assim uma emulsão com melhor controle do tamanho de gotas (LEAL-CALDERON; SCHMITT; BIBETTE, 2007).

Quanto às aplicações de emulsões, estas estão presentes em diversos setores que contemplam desde a indústria de cosméticos, com hidratantes, loções, sprays para cabelo e protetor solar; de fármacos, incluindo produtos como microcápsulas e associação de princípio-ativos; de tintas, com emulsões de resinas e de látex; e de alimentos, com produtos como maionese, manteiga, margarina, cremes, sorvetes, molhos, sobremesas, bebidas, entre outros (FRIBERG; LARSSON; SJÖBLOM, 2004; TADROS, 2013).

Apesar da vasta aplicação, a estabilidade das emulsões é um desafio, especialmente no setor alimentício, já que este parâmetro pode interferir diretamente na aceitação dos produtos pelos consumidores. As emulsões possuem a

característica de serem sistemas termodinamicamente instáveis (FRIBERG; LARSSON; SJÖBLOM, 2004). Logo, elas apresentam tendência de retornar ao seu estado inicial ou de apresentarem alguma forma de decomposição. Os processos tradicionais que ocorrem durante a decomposição das emulsões são coalescência, cremeação, sedimentação, floculação, inversão de fases e maturação de Ostwald, sendo ilustrados pela Figura 5 (TADROS, 2013).

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DOS PROCESSOS DE DECOMPOSIÇÃO DE EMULSÕES.



Fonte: TADROS (2013).

Assim, se torna necessário incorporar algum agente capaz de melhorar a estabilidade das emulsões e consequentemente evitar sua rápida decomposição. Neste sentido, os emulsificantes possuem importante papel, uma vez que auxiliam na formação das emulsões e aumentam a estabilidade do sistema (ARAÚJO, 2011). Portanto, além da presença de água e óleo como componentes básicos para a formação das emulsões, há a necessidade da adição de um agente emulsificante. Desta forma, estes aditivos serão abordados melhor a seguir.

1.3.1 Emulsificantes

De acordo com a Portaria nº 540 de 1997, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, um emulsificante pode ser definido como “substância que torna possível a formação ou manutenção de uma mistura uniforme de duas ou mais fases imiscíveis no alimento” (BRASIL, 1997, p. 4).

Os emulsificantes atuam formando camadas protetoras na superfície das gotículas produzidas durante a homogeneização, assim reduzem a tensão interfacial entre os líquidos imiscíveis e permitem sua mistura, conferido estabilidade à emulsão (McCLEMENTS, 2007). A ação dos emulsificantes acontece pelo fato de sua estrutura química ser formada por moléculas anfifílicas. Estas moléculas apresentam ao mesmo tempo características hidrofílicas, pela porção polar, e características hidrofóbicas, devido à porção apolar da molécula. Desta forma, o grupo polar do emulsificante interage com as moléculas de água, enquanto que o grupo apolar atua na fase lipídica, permitindo, assim, que as fases inicialmente imiscíveis se misturem para dar origem à emulsão. Os emulsificantes podem ser tensoativos ou polímeros. Os emulsificantes tensoativos, também denominados de surfatantes, possuem moléculas formadas por uma cabeça polar, e uma cauda apolar. Enquanto os polímeros, como proteínas e polissacarídeos, apresentam regiões polares e apolares distribuídas pela molécula (DALTIM, 2011; SCHRAMM, 2005).

A presença de tensoativos diminui a tensão, pois reduz as interações entre grupos apolares e a água. Os tensoativos ocupam a superfície da emulsão, reduzindo a força de coesão entre as moléculas do solvente e, conseqüentemente, a tensão superficial. Após saturação da superfície, no entanto, o aumento na concentração de tensoativo não apresenta mais efeito sobre o valor da tensão superficial, o que indica que a concentração micelar crítica (CMC) foi atingida, com formação espontânea de agregados moleculares coloidais (micelas). A CMC depende da estrutura do tensoativo e das condições experimentais (BEHRING et al., 2004; SANTOS; PANAGIOTOPOULOS, 2016).

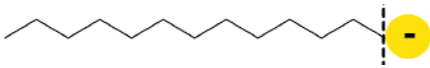
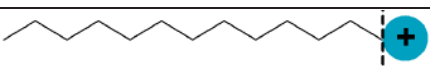
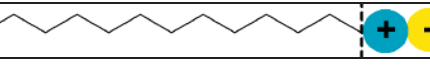
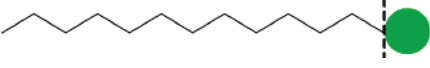
Os emulsificantes utilizados no processamento de alimentos também podem ser classificados em: surfatantes de baixa massa molar, monoglicéridos,

polissorbatos, ésteres de sacarose, lecitina, etc; e emulsificantes macromoleculares, como as proteínas do leite e de ovos (DICKINSON, 2003).

De acordo com sua polaridade, ou seja, com o tipo de carga presente nas cabeças hidrofílicas, os surfatantes ainda podem ser classificados em: aniônicos, catiônicos, anfóteros (zwiteriônico) e não iônicos, Tabela 7 (VISEU et al., 2007).

De acordo com Effendy e Maibach (1995) e Vlachy et al. (2009), os surfatantes não iônicos têm um efeito tóxico menor que os catiônicos, aniônicos e anfóteros, sendo a toxicidade dos surfatantes catiônicos a mais alta. Por esta razão, o Tween 80, por exemplo, que é um surfatante sintético não iônico, formado por sorbitano polietoxilado e ácido oleico, é frequentemente usado em vários cosméticos, produtos farmacêuticos e indústrias de alimentos (GOMES; COSTA; CUNHA, 2018; VICENTE et al., 2018).

TABELA 7 - CLASSIFICAÇÃO DOS SURFATANTES DE ACORDO COM A SUA POLARIDADE.

Classe de surfatante	Estrutura (cauda + cabeça)	Exemplo
Aniônicos		Dodecil sulfato de sódio (SDS), Sulfonato de alquilbenzeno linear (LAS)
Catiônicos		Lauramina hidrocloreídrica, Cloreto de cetilpiridínio
Anfóteros		Betaína, Lecitina
Não iônicos		Ésteres de sorbitan (Span 20, Span 40), Polissorbatos (Tween 80, Tween 20),

Fonte: Adaptado de FELIPE; DIAS (2017).

Há também uma classificação dos emulsificantes com relação a sua composição molecular, denominada de Balanço Hidrofílico Lipofílico (BHL), que se baseia no fato de que toda molécula de tensoativo apresenta um grupo lipofílico e outro hidrofílico. Nesta classificação, desenvolvida por Griffin (1949) para seleção de surfatantes, cada tensoativo recebe um número que varia de 1 a 18, de acordo com o balanço entre os grupos. Estes valores atribuídos pelo sistema BHL indicam a polaridade do tensoativo. Assim, tensoativos altamente polares possuem valores mais elevados do que àqueles de caráter mais lipofílico, com BHL entre 8 a 18 e entre 3 a 6, respectivamente (MORRISON; ROSS, 2002; TADROS, 2013). A Tabela 8 apresenta os valores de BHL com sua respectiva aplicação nas emulsões.

TABELA 8 - VALORES DE BHL E RESPECTIVA APLICAÇÃO.

BHL	Aplicação
3 a 6	Emulsificantes (A/O)
7 a 9	Umectantes
8 a 18	Emulsificantes (O/A)
13 a 15	Detergentes
15 a 18	Solubilizantes

Fonte: Adaptado de TADROS (2013).

1.3.2 Emulsões com proteínas do soro e análises de caracterização

Dentre as proteínas lácteas, as proteínas do soro vêm ganhando destaque pela suas propriedades funcionais, especialmente solubilidade e poder emulsificante (NISHANTHI et al., 2017). As proteínas do soro são consideradas surfatantes naturais, usadas para emulsionar e estabilizar as emulsões, devido sua estrutura globular com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos (GOMES; COSTA; CUNHA, 2018). Em função disso, sua aplicação em substituição ou em combinação ao tipo sintético de surfatante tem sido amplamente empregada, como pode ser observado na Tabela 9.

Em geral, as pesquisas envolvendo a aplicação das proteínas do soro têm explorado a caracterização e determinação das propriedades conferidas às emulsões. A caracterização das emulsões facilita a compreensão dos principais fatores que influenciam seu processamento e sua estabilidade.

O tamanho das gotículas de uma emulsão, por exemplo, é um parâmetro muito importante, pois influencia propriedades da emulsão, como estabilidade, coalescência, textura, cor e vida útil (HENRY et al., 2009; JURADO et al., 2007). Para medir o tamanho de gotas e sua distribuição nas emulsões diferentes métodos podem ser adotados. Os principais são microscopia óptica (GUZEY; MCCLEMENTS, 2006), espalhamento de luz (Mastersizer), espectroscopia ultrassônica (Ultrazizer), difração de laser (GHARSALLAOUI et al., 2010; LI et al., 2010), turbidimetria, técnica de coloração, entre outros (MCCLEMENTS; COUPLAND, 1996; NI et al., 1998; SCHRAMM, 2005).

TABELA 9 - PESQUISAS RECENTES DE FORMAÇÃO DE EMULSÕES COM PROTEÍNAS DO SORO.

Objetivo	Composição da emulsão	Análises de caracterização	Referência
Avaliar o efeito de tratamentos térmicos na interface água-óleo em relação à textura da emulsão	Mistura aquosa de micelas de caseína e WPI + gordura anidra de leite	Distribuição do tamanho de gotículas, reologia, concentração interfacial de proteínas	Surel et al. (2014)
Formar géis de emulsão usando combinação de gliadina e proteína de soro de leite	Nanopartículas de gliadina + WPI + óleo de milho	Distribuição do tamanho de gotículas, reologia, potencial-zeta, microscopia confocal	Zhu et al. (2017)
Verificar a habilidade de formação de emulsão de WPI e peptídeos	WPI ou hidrolisado proteico + óleo com triglicerídeos de cadeia média	Distribuição do tamanho de gotículas, estabilidade da emulsão, potencial-zeta, propriedades interfaciais	Schröder et al. (2017)
Avaliar o impacto do ultrassom na interação pectina e WPC e seu efeito na estabilidade de emulsões	Pectina + WPC + óleo de soja	Reologia, potencial-zeta, turbidimetria, distribuição do tamanho de gotículas, microscopia óptica e confocal	Albano e Nicoletti (2018)
Estudar a influência do pH e força iônica nas propriedades e estabilidade de emulsões O/A contendo WPI	WPI + óleo de soja + goma xantana	Distribuição do tamanho de gotículas, potencial-zeta, microscopia confocal, reologia, avaliação visual de <i>creaming</i>	Sriprabhom et al. (2018)
Avaliar a estabilidade térmica de emulsões preparadas com microgéis de proteína de soro de leite	Proteínas do soro em pó preparada na forma de microgel + gordura anidra de leite	Distribuição do tamanho de gotículas, microscopia confocal, quantificação das proteínas adsorvidas nas gotículas de gordura	Chevallier et al. (2016, 2018)
Fabricar e caracterizar géis de emulsões estabilizados por isolado de proteína de soro	WPI + óleo de girassol, WPI desnaturada + óleo de girassol	Distribuição do tamanho de gotículas, potencial-zeta, estabilidade do <i>creaming</i> , viscosidade, estabilidade térmica	Mohammadian et al. (2018)
Avaliar o efeito do tratamento térmico sobre propriedades físico-químicas e emulsionantes de WPC e WPI polimerizados	WPC ou WPI polimerizados termicamente + óleo de soja	Atividade emulsificante, índice de estabilidade, potencial-zeta, microscopia	Jiang et al. (2018)
Investigar o efeito da adição de glucomanano do konjac (KGM) na estruturação da fase aquosa de emulsões O/A	WPI + óleo de girassol + KGM	Tamanho de gotículas, potencial-zeta, estabilidade do <i>creaming</i> , estabilidade térmica e ao pH, reologia	Lu et al. (2018)
Determinar o impacto do pH nas propriedades de emulsões estabilizadas com proteína e polissacarídeos	WPI + óleo de peixe Menhaden + goma xantana + goma de alfarroba	Reologia, tamanho de gotículas, índice de <i>creaming</i> , microscopia, análise de oxidação lipídica	Owens et al. (2018)
Estudar o impacto do tipo de óleo e razão WPI/Tween 80 na interface de emulsões	WPI + óleo de girassol (de cadeia média e de cadeia longa) + Tween 80	Distribuição do tamanho de gotículas, microscopia óptica, potencial-zeta, estabilidade por turbidimetria e tensão interfacial	Gomes et al. (2018)

O método que determina o tamanho e a distribuição do tamanho de gotículas da emulsão que tem sido amplamente empregado é o que utiliza o instrumento de espalhamento de luz estático, equipamento conhecido como MasterSizer (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Este método foi utilizado no trabalho de Zhu et al. (2017), para verificar a distribuição do tamanho de partículas dos géis de emulsão formados pela combinação de gliadina e proteínas do soro. O mesmo equipamento foi utilizado por Chevallier et al. (2018) para determinar o tamanho e distribuição de tamanho das gotículas de gordura em emulsões visualmente estáveis de proteínas do soro e gordura anidra de leite.

A avaliação da estabilidade também é uma análise fundamental no estudo de emulsões. A estabilidade pode ser avaliada por métodos que simulam condições de temperatura durante o transporte e o armazenamento das emulsões (TCHOLAKOVA et al., 2005). Em geral, após armazenamento das emulsões sob as condições desejadas, estas são analisadas por turbidimetria para determinação do índice de estabilidade da emulsão (IEE). Jiang et al. (2018) empregaram este método para avaliar a estabilidade de emulsões preparadas com proteínas do soro concentradas e isoladas submetidas a aquecimento. Albano e Nicoletti (2018) também verificaram a estabilidade através da técnica de turbidimetria para emulsões preparadas com óleo de soja e diferentes razões de WPC e pectina. O método consiste em realizar leituras de absorbância em torno de 500 nm em espectrofotômetro UV-Vis durante tempos pré-determinados.

Uma outra abordagem da análise de estabilidade por turbidimetria é utilizando um equipamento denominado Turbiscan, como realizado por Liang et al. (2013) para avaliação da estabilidade de emulsões compostas por proteínas do leite e óleo de milho. A mesma metodologia foi empregada por Gomes et al. (2018) durante monitoramento da estabilidade de emulsões preparadas com óleo de girassol e emulsificantes WPI + Tween 80. Este equipamento possui detectores que escaneiam todo o comprimento de um tubo contendo a emulsão, permitindo a detecção dos processos de floculação e coalescência, mesmo em um estágio inicial (LEMARCHAND et al., 2003; MENGUAL et al., 1999).

Outra forma de avaliar a estabilidade de emulsões é pelo método de centrifugação, onde os processos de sedimentação ou formação de creme (*creaming*) que podem levar à coalescência podem ser visualizados. Esta metodologia foi adotada por Schröder et al. (2017), utilizando uma centrífuga de

baixa velocidade equipada com detector de infravermelho, para investigar a estabilidade contra a formação de creme de emulsões preparadas com WPI e hidrolisados de proteínas.

A estabilidade com relação à formação de creme também pode ser determinada de forma mais simples, com análise visual da altura da emulsão disposta em recipiente graduado. Assim foi realizado por Mohammadian et al. (2018) para avaliar a estabilidade à formação de creme de diferentes amostras de emulsão, preparadas com WPI e óleo de girassol, após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente em tubos cilíndricos selados.

Além das caracterizações comentadas, diversas outras propriedades de emulsões preparadas com proteínas de soro vêm sendo exploradas, como tensão interfacial (GOMES et al., 2018), análise de oxidação lipídica (OWENS et al., 2018), propriedades reológicas (LU et al., 2018; SRIPRABLOM et al., 2019; SUREL et al., 2014) e potencial-zeta (GOMES et al., 2018; SRIPRABLOM et al., 2019).

1.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA LACTOSE

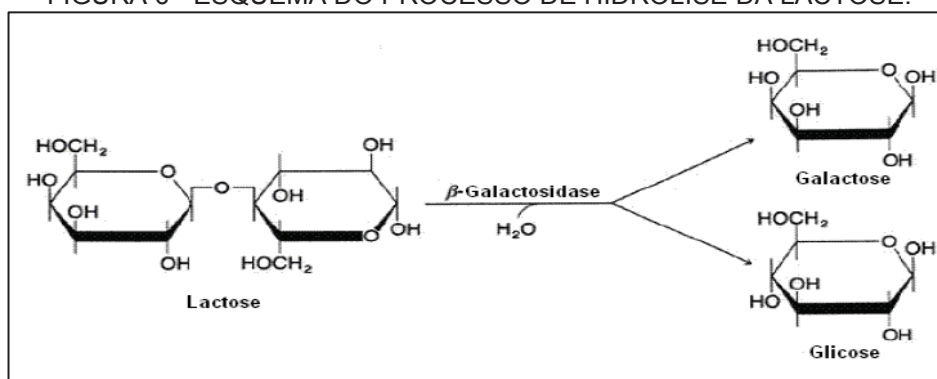
O processo de hidrólise da lactose é considerado como promissor em escala industrial, porque possibilita o desenvolvimento de produtos que podem ser consumidos por intolerantes a este carboidrato. Além de oferecer algumas vantagens tecnológicas e sensoriais, que incluem a diminuição da cristalização da lactose em produtos lácteos e o aumento do poder adoçante, também proporciona melhor biodegradabilidade do soro de leite (MLICHOVÁ; ROSENBERG, 2006; VERMA et al., 2012).

A hidrólise da lactose pode ser realizada pelo método ácido ou pelo método enzimático. No método ácido a reação de hidrólise ocorre rapidamente, mas as condições operacionais são severas, com valores de temperatura acima de 100 °C e pH entre 1,0 e 2,0. Além disso, envolve soluções diluídas de ácidos fortes, como sulfúrico e clorídrico. Devido às necessidades de operação, o método ácido possui aplicação restrita na indústria de alimentos, já que pode causar desnaturação das proteínas do leite e provocar alterações de cor e sabor dos alimentos. A hidrólise enzimática utiliza condições mais amenas, com temperatura em torno dos 40 °C, o

que evita as alterações nos produtos obtidos, além de demandar menor energia (BAILEY; OLLIS, 1986; GEKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985).

Na indústria de alimentos, o processo de hidrólise enzimática é utilizado para obtenção dos produtos lácteos sem lactose ou com teor de lactose reduzido, no qual a enzima β -galactosidase, hidrolisa a ligação $\beta(1-4)$ da molécula de lactose, originando os monômeros glicose e galactose, como observado na Figura 6 (GEKAS; LOPEZ-LEIVA, 1985; VASILEVA et al., 2016).

FIGURA 6 - ESQUEMA DO PROCESSO DE HIDRÓLISE DA LACTOSE.



Fonte: VIEIRA (2009).

A enzima β -galactosidase é uma hidrolase, também conhecida como lactase, ou ainda pela denominação β -D-galactosideo-galactohidrolase, EC 3.2.1.23. Esta enzima é responsável por catalisar a reação de hidrólise da lactose e pode ser encontrada na natureza, em vegetais e em órgãos de animais. A β -galactosidase também pode ser obtida por vários micro-organismos, que incluem bactérias, leveduras e fungos filamentosos, como apresentado pela Tabela 10 (VERMA et al., 2012).

TABELA 10 - PROPRIEDADES DE β -GALACTOSIDASES OBTIDAS POR DIFERENTES MICRO-ORGANISMOS.

Fonte	Micro-organismo	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Massa molecular (kDa)
Leveduras	<i>Kluyveromyces lactis</i>	6,5 - 7,3	30 - 35	135
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	6,6	30 - 35	201
Fungos	<i>Aspergillus niger</i>	3,0 - 4,0	55 - 60	124
	<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5	50 - 55	90
Bactérias	<i>Escherichia coli</i>	7,2	40	540
	<i>Lactobacillus thermophilus</i>	6,2	55	540
	<i>Leuconostoc citrovorum</i>	6,5	60	-
	<i>Bacillus circulans</i>	6,0	65	-

Fonte: Adaptado de FISCHER (2010); MLICHOVÁ; ROSENBERG (2006).

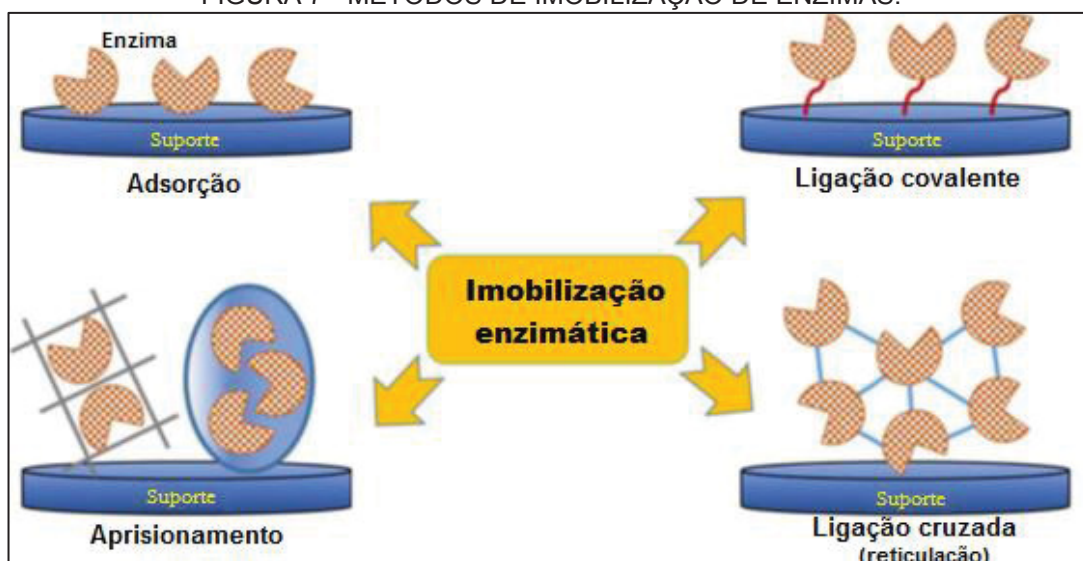
1.4.1 Imobilização de enzimas

O processo de hidrólise pode ser conduzido com a enzima na forma livre ou imobilizada, porém o primeiro modo impossibilita a estabilidade da enzima para usos prolongados. A possibilidade de reutilização da enzima oferecida pelo sistema de imobilização torna esta técnica bastante vantajosa, já que este oferece redução das despesas operacionais. Além de outras vantagens como as citadas por Gómez et al. (2005), Szymanska et al. (2007) e Verma et al. (2012):

- Possibilidade de operação em processos contínuos;
- Permite um grande aproveitamento econômico;
- Promove a reutilização sem um significativo decréscimo da atividade;
- Utilização de menor volume de reator, pois a enzima imobilizada pode ser utilizada em alta concentração em menor volume;
- Maior facilidade de controle do processo;
- Facilidade de separação do produto final;
- Facilidade de interrupção da reação.

As técnicas utilizadas para imobilização de enzimas são classificadas em físicas e químicas. A retenção física pode ser por aprisionamento da enzima em uma matriz polimérica, cápsula ou membrana; ou por adsorção da enzima à superfície de um suporte. No método químico, a imobilização pode ocorrer por ligação covalente da enzima a um material insolúvel, ou por ligações cruzadas (reticulação ou *cross-linking*) (LIU et al., 2018; NGUYEN; KIM, 2017). A Figura 7 ilustra os principais métodos de imobilização de enzimas.

FIGURA 7 - MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.



Fonte: Adaptado de NGUYEN e KIM (2017).

A escolha da técnica de imobilização mais apropriada irá depender da enzima utilizada, do processo que se deseja realizar e das propriedades do suporte adotado. Além disso, em alguns casos, a imobilização enzimática pode ser realizada pela combinação de diferentes métodos. Por exemplo, uma enzima pode ser pré-imobilizada em esferas por adsorção ou ligação covalente e posteriormente ser aprisionada em uma matriz polimérica (GUISAN, 2013).

Cada um dos métodos de imobilização possuem vantagens e desvantagens que influenciam na tomada de decisão da técnica a ser empregada, Tabela 11.

TABELA 11 - VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.

Método	Vantagens	Desvantagens
Adsorção	Simples, baixo custo, pequenas mudanças na enzima, nenhum agente adicional é necessário	Interação enzima-adsorvente é fraca (ocorre dessorção, lixiviação), suscetível a pH e temperatura
Aprisionamento	Baixo custo, alta atividade catalítica, boa estabilidade pois minimiza a lixiviação e desnaturação enzimática	Limitação da transferência de massa, suporte pode se romper
Ligação covalente	Ligações fortes entre enzimas e matriz, pouco vazamento de enzima do suporte	Processo mais complexo, alto risco de desnaturação proteica, diminuição da atividade enzimática
Reticulação	Método simples, com forte ligação química entre enzima e matriz, portanto o vazamento enzimático é mínimo	Limitação da transferência de massa, diminuição da atividade enzimática e alteração conformacional da enzima

Fonte: GUISAN (2013), LIU et al. (2018), NGUYEN e KIM (2017).

Para a escolha da matriz utilizada para a imobilização, algumas características devem ser consideradas, como: diâmetro da partícula, resistência física à compressão, inércia para enzimas, caráter hidrofílico, resistência microbiana e disponibilidade a baixo custo (BUCHHOLZ; KLEIN, 1987; KHAN; ALZOHAIY, 2010; TREVAN, 1980).

Os suportes utilizados para imobilização podem ser classificados, de acordo com sua composição química, em inorgânicos e orgânicos. Entre os materiais inorgânicos os principais são bentonita, sílica, vidros e óxidos metálicos. Os suportes orgânicos podem ser subdivididos em naturais (celulose, ágar, quitosana, alginato e colágeno) e sintéticos (poliestireno, poliacrilamida e outros polímeros). As matrizes inorgânicas possuem vantagens como alta estabilidade contra a degradação física, química e microbiana. Entretanto, a maioria das aplicações industriais são realizadas com matrizes orgânicas, devido ao seu caráter hidrofílico, o qual é um dos fatores mais importantes para a atividade enzimática (GUISAN, 2013).

Alguns materiais como quitosana, celulose-gelatina, membranas, nanopartículas de sílica, esferas de alginato de sódio e de cálcio se destacam entre as pesquisas e têm sido comumente empregados para imobilizar enzimas de interesse na área de alimentos (ANSARI; HUSAIN, 2011; DAS et al., 2015; VERMA et al., 2012). A β -galactosidase é uma das enzimas que vem sendo imobilizada em suportes como os previamente citados, especialmente para hidrólise da lactose presente no soro de leite, o que foi abordado na seção a seguir.

1.4.2 Estudos de hidrólise da lactose do soro de leite

Os principais e mais recentes estudos sobre a hidrólise da lactose do soro do leite estão compilados na Tabela 12, sendo alguns comentados a seguir.

TABELA 12 - ESTUDOS DA HIDRÓLISE DA LACTOSE DO SORO DE LEITE.

Fonte de lactose	Enzima empregada	Forma da enzima	Referências
Soro do colostro bovino	β -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i>	Livre	Moura Bell et al. (2016, 2018)
Soro desmineralizado	β -galactosidase de <i>Penicillium</i> sp.	Livre	Bassetto et al. (2017)
Soro de queijo fresco	β -galactosidase de <i>Aspergillus lacticoffeatus</i>	Livre	Cardoso et al. (2017)
	β -Galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i>	Livre	Ghosh et al. (2017)
	β -Galactosidase de <i>Escherichia coli</i>	Imobilizada em membrana de polipropileno	Vasileva et al. (2016)
Soro de queijo de cabra	β -Galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i>	Livre	Aquino et al. (2017)
Solução de lactose e permeado do soro	β -galactosidase de <i>Kluyveromyces fragilis</i>	Imobilizada em membrana de polietersulfona	Regenhardt et al. (2013)
Solução de lactose, leite e soro	β -Galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i>	Imobilizada em esferas de alginato de cálcio, Concanavalina A, nanopartículas de óxido de zinco	Ansari; Husain (2010, 2012, 2011; Haider e Husain 2009; Husain et al. (2011)
Leite e soro em pó	β -galactosidase de <i>Paenibacillus barengoltzii</i>	Livre	Liu et al. (2017)
Soro dos queijos Muçarela, Prato, Goya, Danbo e Manchego	β -galactosidase de <i>Bacillus circulans</i>	Imobilizada em suportes acrílicos comerciais (Eupergit C e Sepabeads EP)	Torres e Batista-Viera (2012)
Permeado do soro de leite	β -galactosidase de <i>Bacillus circulans</i>	Livre	Das, Bhattacharjee e Bhattacharjee (2013)
	β -Galactosidase de <i>Escherichia coli</i>	Livre	Jayamuthunagai et al.(2017)
	β -Galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i> e <i>Kluyveromyces lactis</i>	Livre	Jin et al. (2016)
	Enzima comercial Lactozym Pure® 6500 L	Livre	Trigueros et al. (2016)
Soro em pó	β -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i>	Imobilizada em esferas de alginato de cálcio e gelatina	Mörschbacher, Volpato e Souza (2016)

Ansari e Husain (2010, 2012, 2011) estudaram a hidrólise da lactose presente no leite e soro de leite usando β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em um suporte de Concanavalina A (Con A) e compararam esta abordagem ao processo empregando a enzima na forma livre. Os autores observaram que a β -

galactosidase imobilizada exibiu estabilidade significativamente maior do que a enzima livre, contra vários tipos de desnaturantes e durante o armazenamento. Além disso, a enzima imobilizada pode ser utilizada para hidrolisar a lactose do leite e do soro, tanto em processos descontínuos como contínuos.

Haider e Husain (2009) compararam a hidrólise da lactose presente no leite e no soro de leite utilizando a enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em esferas de alginato de cálcio com o processo que emprega a enzima livre. Os autores observaram que a β -galactosidase imobilizada foi mais eficiente na hidrólise da lactose do que a forma da enzima livre. Obteve-se como resultado a hidrólise de 77% da lactose presente no leite e 86% no soro de leite.

Esferas de alginato de cálcio e gelatina também foram empregadas na imobilização de β -galactosidase de *Kluyveromyces lactis* por Mörschbächer, Volpato e Souza (2016), durante processo de hidrólise da lactose do soro de leite, alcançando como resultado a conversão máxima de 72%.

Membranas também foram empregadas como suporte para a imobilização da enzima β -galactosidase de *Escherichia coli*. Os autores avaliaram a hidrólise da lactose presente no soro utilizando a enzima β -galactosidase imobilizada em um reator com membrana em espiral e compararam esse procedimento ao processo realizado com a enzima livre. Os autores relataram que a hidrólise da lactose pela enzima imobilizada foi 1,6 vezes mais eficiente que quando utilizada a enzima livre. Além disso, a enzima imobilizada apresentou alta estabilidade durante o processo, mesmo após vários ciclos (VASILEVA et al., 2016).

Além disso, técnicas integradas têm sido utilizadas em processos biotecnológicos que empregam soro de leite, como nos estudos de Jin et al. (2016), Kokkiligadda et al. (2016) e Beniwal et al. (2018), em que a degradação da lactose foi realizada simultaneamente com a fermentação, a fim de facilitar a produção de etanol, sendo outra alternativa para uso do soro de leite.

Entretanto, apesar das inúmeras pesquisas e esforços dos pesquisadores no sentido de desenvolvimento de métodos capazes de promover a hidrólise do soro de leite, não há processos que integrem este procedimento com a etapa de recuperação das proteínas. Ademais, ainda não existem processos que possibilitem a recuperação das proteínas e hidrólise da lactose de forma simultânea, em um só procedimento, o que facilitaria o processo de tratamento e aproveitamento dos componentes do soro e, conseqüentemente, despertaria o interesse por parte dos

laticínios e demais indústrias que poderiam utilizar os componentes do soro como matéria-prima.

CAPÍTULO II

**CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE POR
ULTRAFILTRAÇÃO: AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS E DO
MECANISMO DE *FOULING***

RESUMO

O soro de leite possui grande importância global, tanto pelo seu alto volume gerado a partir da produção de queijo, quanto pela sua rica composição. As proteínas do soro, em especial, apresentam excelente qualidade nutricional e propriedades funcionais. Essas características não se restringem ao soro de origem bovina, mas se estendem ao soro de leite de búfala e de cabra. Assim, neste capítulo da pesquisa, a concentração de proteínas, o fluxo de permeado e os mecanismos predominantes de *fouling* foram investigados durante a ultrafiltração (UF) de diferentes amostras de soro. A pesquisa foi realizada utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR), variando a temperatura na faixa de 16 a 44 °C e a pressão de 10 a 70 kPa. A concentração proteica de aproximadamente 37 g L⁻¹ foi obtida para o soro bovino reconstituído, nas condições de 60 kPa e 40 °C. O fluxo máximo observado foi de 8,9 e 7,9 kg m⁻² h⁻¹, respectivamente, para o soro bovino reconstituído e fresco, durante UF a 50 kPa e 30 °C. A ultrafiltração dos soros de leite de cabra e de búfala resultou em menor fluxo de permeado, provavelmente devido aos elevados teores de proteínas e cálcio destas amostras. Além disso, verificou-se que as condições do processo de maior pressão e temperatura favoreceram o fluxo de permeado, sendo o efeito da pressão mais expressivo e observado somente até valores limite, em torno de 40-50 kPa. O melhor ajuste, verificado pelo modelo de Ho e Zydney, sugere que o *fouling* observado durante a UF de todos os soros analisados ocorre devido ao bloqueio dos poros e posterior depósito na superfície da membrana. Por fim, concentrados com teor de proteína acima de 59,4% foram obtidos para todas as amostras de soro de leite estudadas.

Palavras-chave: Concentração de proteínas; Soro de leite de cabra; Soro de leite de búfala; *Fouling*; Fluxo de permeado.

2 CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE POR ULTRAFILTRAÇÃO: AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS E DO MECANISMO DE *FOULING*

2.1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de leite vem crescendo há várias décadas. Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a produção aumentou de 500 milhões de toneladas em 1983 para aproximadamente 830 milhões de toneladas em 2018 (FAO, 2018). O leite de vaca corresponde a 83% do leite produzido e o leite de búfala a 14%, sendo o restante produzido por cabras, ovelhas e camelas (VILLA et al., 2018).

Do total de leite produzido na Europa, por exemplo, 37% são destinados ao fabrico de queijos (EUROSTAT, 2019). A maior parte do leite usado na produção de queijo é transformado em soro após a coagulação da proteína. Em média, 9 L de soro são gerados para cada kg de queijo produzido. No entanto, embora no passado já fosse considerado resíduo devido ao seu alto impacto ambiental, aliado a altos valores de demanda química e bioquímica de oxigênio (DQO e DBO), o soro de leite possui uma importante composição nutricional (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011; SMITHERS, 2008).

Tendo em vista a importância e o grande volume de soro, surgiu a necessidade de desenvolver processos para recuperar e concentrar seus nutrientes, bem como evitar seu descarte e impacto ambiental. O principal alvo dos processos que aplicam membranas é a recuperação das proteínas do soro, que possuem uma qualidade nutricional amplamente conhecida, devido ao seu valor biológico superior ao do ovo, carne e proteína de soja (SMITHERS, 2015). Várias pesquisas indicam a importância das proteínas do soro para a saúde (AKHAVAN et al., 2014; BRANDELLI et al., 2015; IBRAHIM et al., 2017).

Além disso, as proteínas do soro também possuem propriedades funcionais de interesse para a indústria, tais como solubilidade, poder emulsionante, gelificação e formação de espuma (NISHANTHI et al., 2017). Por outro lado, a alergia ao leite de vaca é uma das alergias alimentares mais comuns devido às suas proteínas, que muitas vezes acabam restringindo seu consumo (VILLA et al., 2018). Portanto, as proteínas do leite de outras fontes também precisam ser pesquisadas e aplicadas

industrialmente. O leite de cabra, por exemplo, apresenta excelente qualidade, boa digestibilidade e é bem tolerado por indivíduos suscetíveis e alérgicos ao leite de vaca (POPESCU, 2013).

No entanto, as informações da literatura sobre o soro fresco e sobre a recuperação de suas proteínas são escassas, pois a maioria das pesquisas usa concentrado proteico de soro ou isolado para simular o soro de leite. Além disso, nenhum estudo foi encontrado relatando uma comparação entre as diferentes origens de soro de leite em relação ao desempenho do processo de ultrafiltração. Quanto aos processos de separação por membranas, o principal desafio ainda é identificar as condições de processo que minimizem os efeitos dos fenômenos restritivos ao fluxo, conhecidos como polarização por concentração e *fouling*. Entre os principais parâmetros que afetam o fluxo de permeado estão a pressão, temperatura e concentração de alimentação (REZAEI et al., 2011).

Assim, o presente trabalho estudou o processo de ultrafiltração para recuperação das proteínas do soro de leite bovino reconstituído a partir do soro em pó e soros frescos de origem bovina, caprina e bubalina, utilizando diferentes temperaturas e pressões. As ferramentas utilizadas nesta pesquisa foram o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e a metodologia de Superfície de Resposta (MSR), que permitem a escolha de variáveis que influenciam de maneira significativa a resposta avaliada. Além disso, os fluxos de permeado foram avaliados e foram identificados os mecanismos de incrustação predominantes durante o processo de ultrafiltração.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Amostras de soro de leite

Inicialmente, foi utilizado o soro de leite bovino reconstituído a partir do soro em pó, do tipo doce, proveniente da produção de queijo *Mozzarella*, o qual foi doado pela Alibra Ingredients Ltda (Campinas, SP, Brasil). Para a preparação da amostra, o soro em pó foi reconstituído por dissolução manual em água destilada a temperatura ambiente (22 °C), obtendo-se uma solução com teor de sólidos solúveis

de 6% (m/v). Esta concentração foi adotada para simular o teor de sólidos solúveis do soro de leite fresco.

O soro em pó é mais estável, possui maior tempo de armazenamento e contém todos os constituintes sólidos do soro original (fresco). Além disso, sua utilização neste trabalho garantiu a homogeneidade inicial dos experimentos, o que permitiu que apenas os efeitos das variáveis de processo influenciassem os resultados do planejamento experimental adotado.

Após realização dos experimentos nas condições do planejamento experimental, foram conduzidos ensaios nas melhores condições de processo utilizando diferentes soros de leite frescos.

As amostras de soro de leite fresco de origem bovina, caprina e bubalina foram doadas gentilmente pela Escola de Tecnologia de Leite e Queijo dos Campos Gerais (ETLQueijos) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Ponta Grossa, PR, Brasil). As amostras de soro bovino e bubalino foram obtidas da produção de queijo *mozzarella* e a amostra de origem caprina a partir da produção de queijo *feta*. Todas as amostras foram armazenadas em freezer (-18 °C), descongeladas (8 °C) e homogeneizadas horas antes de cada experimento. Além disso, as amostras de soro fresco passaram por peneira de 200 *mesh*, antes do processo de UF, para remoção dos finos de queijo.

2.2.2 Caracterização físico-química

As quatro amostras de soro de leite, bem como os concentrados e permeados obtidos do processo de UF foram caracterizados por meio de análises físico-químicas. Todos os laboratórios envolvidos nestas análises estão situados na Universidade Federal do Paraná (UFPR), e são eles: Laboratório de Emulsões (Emultec), Laboratório de Análise de Alimentos do Programa de Pós-graduação em Alimentação e Nutrição, Laboratório de Análises de Combustíveis Automotivos (LACAUT) e Laboratório de Engenharia Ambiental Professor Francisco Borsari Netto (LABEAM). Todas as análises foram realizadas em triplicata e estão descritas a seguir.

a) Determinação do extrato seco total

A quantidade total de matéria seca não volátil em uma amostra pode ser determinada pela medida do extrato seco total (EST), também denominada de teor de sólidos totais (ST). Esse parâmetro foi determinado pela técnica gravimétrica descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

A técnica consiste em secar a amostra desejada, evaporando-se a água e substâncias voláteis presentes, e pesar o extrato seco obtido. Para isso, alíquotas de amostra de massa conhecida foram adicionadas em cápsulas previamente taradas e então secas em estufa a 103 ± 2 °C até obtenção de massa de amostra constante. Após resfriamento, as amostras foram pesadas e o extrato seco total foi determinado com base na diferença de massa de amostra antes e depois da secagem.

b) Análise de pH

As medições de pH foram realizadas em pHmetro digital, marca GEHAKA e modelo PG 1800. O pHmetro possui precisão de $\pm 0,02$ e confiança de 95%. O equipamento foi calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0 conforme as instruções do fabricante.

c) Turbidez

A turbidez das amostras foi determinada utilizando o turbidímetro digital Policontrol, modelo AP 2000. O equipamento compara o espalhamento de um feixe de luz ao passar pela amostra com o espalhamento de um feixe de igual intensidade ao passar por uma suspensão padrão. Os resultados foram expressos em Unidade Nefelométrica de Turbidez (NTU) e a calibração foi realizada com suspensões padrões de 0,1; 20; 100 e 800 NTU.

d) Determinação do teor de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951), o qual é uma técnica colorimétrica que possibilita a determinação quantitativa de proteínas totais. O método baseia-se na redução da mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), que ocorre na presença de proteína e de catalisador cobre (Cu^{2+}), produzindo um complexo de cor púrpura proporcional à concentração de proteínas presentes na amostra.

O método de Lowry foi empregado neste estudo por se tratar de uma metodologia de leitura direto, ser considerada de alta sensibilidade e boa precisão, além de consumir pouca amostra. De acordo com Antunes (2003), o método de Lowry é até 100 vezes mais sensível do que a reação de Biureto, o qual também é empregado com frequência para quantificação de proteínas.

A albumina bovina foi utilizada para construção de uma curva padrão e o teor de proteína total foi determinado em espectrofotômetro UV-Vis, marca Shimadzu, modelo UV-1800, no comprimento de onda de 750 nm.

e) Análise de lactose

A determinação da concentração de lactose foi realizada segundo metodologia descrita por Miller (1959), que emprega o método do ácido dinitrosalicílico, também conhecido como método DNS.

Este método consiste na determinação de açúcares redutores por espectrofotometria e baseia-se no princípio de que o ácido 3,5-dinitrosalicílico após ser reduzido pelos açúcares redutores passa a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, apresentando coloração vermelho-alaranjado.

Uma solução padrão de lactose foi utilizada para construção da curva de calibração e a leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis, marca Shimadzu, modelo UV-1800, no comprimento de onda de 540 nm.

f) Determinação do teor de lipídios

O conteúdo de lipídios presente nas amostras de soro de leite foi determinado pelo método de Roesse-Gottlieb AOAC (2005). Neste método, as amostras são tratadas com amônia e álcool etílico para hidrólise da ligação proteína-gordura. O álcool precipita as proteínas e a amônia as dissolve, enquanto a fração lipídica é extraída com éter etílico e de petróleo. Após a evaporação dos éteres, o teor de lipídios é determinado por gravimetria.

g) Determinação de minerais

A análise de minerais das amostras de soro de leite foi realizada segundo método utilizado para determinação de elementos químicos em alimentos baseado na AOAC (2005). Empregou-se a técnica de Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente, conhecida como ICP-OES (720 ES Varian), do termo em inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*. Optou-se por quantificar apenas os minerais Ca, P, K e Na, pois são os que, conforme a literatura, estão presentes em maior quantidade no soro de leite.

h) Demanda química de oxigênio (DQO)

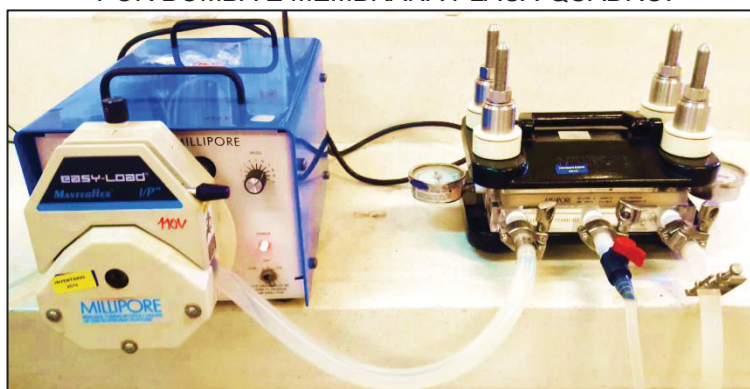
A análise de DQO foi conduzida pelo método colorimétrico com refluxo fechado APHA (2005). Este método consiste na redução do cromo (Cr^{6+} a Cr^{3+}) e subsequente análise através da modificação da coloração, em um espectrofotômetro na região do visível. Para construção da curva de calibração padrão foi utilizado o reagente hidrogenoftalato de potássio (KHP).

O procedimento de digestão das amostras foi realizado a 150°C , durante 2 h e posteriormente as leituras foram obtidas em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-1800, no comprimento de onda de 600 nm.

2.2.3 Processo de ultrafiltração

O processo de UF foi conduzido em escala de laboratório em um sistema de ultrafiltração placa-quadro Pellicon® da Millipore, Figura 8, que opera com fluxo tangencial. A membrana utilizada é composta de poliuretano e polipropileno com massa molecular de corte (*cut-off*) de 10 kDa e área de filtração de 0,5 m². Foi utilizado tanque de alimentação encamisado de capacidade 4 L e banho ultratermostático (Thermomix BM, B. Braun Biotech International).

FIGURA 8 - MÓDULO UTILIZADO DURANTE O PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO, COMPOSTO POR BOMBA E MEMBRANA PLACA-QUADRO.



Fonte: A autora (2020).

No primeiro modo de operação, o concentrado e o permeado foram continuamente reciclados para o tanque de alimentação para assegurar condições de estado estacionário em relação ao volume e composição da alimentação. O soro de leite reconstituído, a partir do soro em pó, foi utilizado nestes testes para definir as melhores condições experimentais de UF por um delineamento composto central rotacional (DCCR). O delineamento experimental 2², com configuração em estrela (quatro pontos axiais) e três pontos centrais, totalizando 11 experimentos, foi realizado variando a temperatura e pressão conforme Tabela 13. A resposta do planejamento experimental foi a concentração de proteínas na corrente de concentrado.

TABELA 13 - VALORES REAIS E CODIFICADOS PARA O PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DOS ENSAIOS DE ULTRAFILTRAÇÃO.

Variáveis independentes	Níveis reais e codificados				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Temperatura (°C)	16	20	30	40	44
Pressão transmembrana (kPa)	10	20	40	60	70

Fonte: A autora (2020).

Os níveis das variáveis foram definidos com base em experimentos preliminares e em informações da literatura e as corridas foram realizadas para obter um modelo de segunda ordem, a fim de prever a retenção de proteínas como função da temperatura e pressão. Todos os experimentos foram realizados de forma aleatória, com 3 L de amostra, durante 40 min de processo.

Após, verificou-se o comportamento do fluxo de permeado através de novos ensaios, mas neste caso para todas as amostras de soro. Estes experimentos foram conduzidos variando a pressão transmembrana na faixa de 10 a 80 kPa, a temperatura fixa de 30 °C.

Posteriormente, o processo de UF foi operado em modo batelada para concentração das proteínas, onde o fluxo de permeado foi continuamente removido do sistema. Neste modo, todas as amostras de soro foram estudadas.

O fluxo de permeado foi obtido por gravimetria usando a Equação 1:

$$J_P = \frac{\Delta m}{S \cdot t} \quad (1)$$

Sendo: J_P é o fluxo de permeado ($\text{kg m}^{-2} \text{h}^{-1}$); Δm é a massa (kg) acumulada na corrente de permeado durante o tempo t (h) e S é a área superficial da membrana (m^2).

A determinação do coeficiente de rejeição (CR), o qual indica a relação entre o soluto que permeia a membrana e o soluto retido na sua superfície, foi realizada empregando a Equação 2, dada em percentual:

$$CR = \left(1 - \frac{C_P}{C_f}\right) \cdot 100 \quad (2)$$

Sendo: C_p a concentração de proteínas no permeado (g L^{-1}) e C_f a concentração de proteínas na alimentação (g L^{-1}).

No modo batelada, o grau de concentração do soro de leite foi determinado pelo fator de concentração (FC), Equação 3.

$$FC = \frac{m_f}{m_f - m_p} \quad (3)$$

Sendo: m_f a massa de soro de leite alimentada (kg) e m_p a massa de permeado (kg) acumulada em determinado tempo t (h).

Após o processo em batelada, as amostras foram submetidas ao processo de liofilização para obtenção dos concentrados proteicos em forma de pó. As condições de liofilização adotadas foram de -50°C , $70\ \mu\text{Hg}$, durante 40 h.

2.2.3.1 Análise das resistências

O modelo das resistências em série avalia a contribuição total dos principais componentes resistivos ao fluxo de permeado (J_p), descrito pela Equação 4:

$$J_p = \frac{\Delta P}{\mu \cdot R_T} \quad (4)$$

Sendo: ΔP é a pressão transmembrana (bar), μ é a viscosidade do permeado (Pa s) e R_T é a resistência total ($\text{m}^2 \text{kg}^{-1}$).

A resistência total (R_t) é o somatório das resistências R_m , R_f e R_p , conforme Equação 5:

$$R_t = R_f + R_m + R_p \quad (5)$$

Sendo: R_f a resistência à formação de *fouling* ($\text{m}^2 \text{ kg}^{-1}$), R_m é a resistência da membrana ($\text{m}^2 \text{ kg}^{-1}$) e R_p é a resistência devido à camada de polarização ($\text{m}^2 \text{ kg}^{-1}$).

O valor da resistência da membrana (R_m) pode ser obtido através da Equação 6:

$$R_m = \frac{\Delta P}{J_w + \mu_w} \quad (6)$$

Sendo: J_w o valor de fluxo com água para a membrana limpa ($\text{kg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) e μ_w a viscosidade da água (Pa h).

Para determinação da resistência devido ao *fouling*, faz-se o cálculo a partir da resistência total, medindo-se o fluxo com água logo após a operação de UF com o soro. Neste caso, a resistência por polarização pode ser desprezada, já que se utiliza somente água e o cálculo pode ser realizado pela Equação 7:

$$R_f = \frac{\Delta P}{J'_w + \mu_w} - R_m \quad (7)$$

Sendo: J'_w o valor de fluxo com água para a membrana suja ($\text{kg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$).

Assim, com os valores de R_m e R_f calculados, a resistência devido à camada de polarização é obtida a partir da resistência total, dada pela Equação 5.

2.2.3.2 Modelos matemáticos

O modelo de bloqueio de poros, proposto por Hérnia (1982) e adaptado por Field et al. (1995) e Barros et al. (2003) é descrito pela Equação 8:

$$\frac{dJ_p}{dt} = -k_n \cdot (J_p - J^*) \cdot J_p^{2-n} \quad (8)$$

Sendo: J_p o fluxo de permeado no tempo t , J^* é o valor do fluxo de permeado no estado estacionário, k_n e n representam o coeficiente fenomenológico e o índice geral de incrustação, respectivamente.

De acordo com o valor de n , quatro mecanismos de bloqueio são propostos, que resulta em diferentes formas integradas correspondentes da Equação 8. A Tabela 14 apresenta as quatro equações algébricas considerando diferentes valores de n , de acordo com Hérnia (1982). O valor de J_0 representa o fluxo no tempo zero e J_{lim} é o fluxo medido no último minuto de operação que se aproxima ao fluxo da região estacionária.

TABELA 14 - MODELOS MATEMÁTICOS DE BLOQUEIO DE POROS.

Modelo	n	Equação	
Bloqueio completo de poros	2,0	$J(t) = J_{lim} + (J_0 - J_{lim}) \cdot \exp^{-k_{2,0} \cdot t}$	(9)
Bloqueio interno de poros	1,5	$\frac{1}{J^{0,5}} = \frac{1}{J_0^{0,5}} + k_{1,5} \cdot t$	(10)
Bloqueio parcial de poros	1,0	$k_1 t = \frac{1}{J_{lim} \left[\ln \left(\frac{J_0 - J_{lim}}{J_0} \right) \cdot \left(\frac{J}{J - J_{lim}} \right) \right]}$	(11)
Torta filtrante	0	$k_0 \cdot t = \frac{1}{J_{lim}^2} \cdot \left[\ln \frac{J}{J_0} \cdot \frac{J_0 - J_{lim}}{J - J_{lim}} - J_{lim} \cdot \left(\frac{1}{J} - \frac{1}{J_0} \right) \right]$	(12)

No entanto, estudos anteriores mostraram que esses modelos simples podem ser insuficientes para descrever o fenômeno de *fouling* no processo de UF. Com base nisso, foram feitos esforços para desenvolver modelos matemáticos combinados mais sofisticados, que levam em conta tanto o bloqueio de poros quanto a formação de torta na superfície da membrana. Assim, o modelo desenvolvido por Ho e Zydney (2000), Equação 13, que considera a incrustação como um processo de dois estágios com bloqueio de poros localizado antes do acúmulo de um depósito de superfície, também foi selecionado para analisar o declínio do fluxo durante a ultrafiltração das amostras de soro.

Assumindo uma resistência uniforme da camada de torta filtrante sobre a superfície da membrana suja, uma equação para J no tempo t foi proposta:

$$J = J_0 \cdot \left[\exp \left(-\frac{\alpha \Delta P C}{\mu R_m} \cdot t \right) + \frac{R_m}{R_m + R_p} \cdot \left(1 - \exp \left(-\frac{\alpha \Delta P C}{\mu R_m} \cdot t \right) \right) \right] \quad (13)$$

Sendo: α é o parâmetro de bloqueio de poros, ΔP é a pressão transmembrana, C é a concentração de proteínas, μ é a viscosidade da solução, R_m é a resistência da membrana limpa e R_p é a resistência devido ao depósito de partículas na superfície da membrana.

2.2.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão. Os efeitos dos tratamentos foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey (p-valor<0,05). As análises estatísticas foram realizadas nos *softwares Excel e Statistica* (10.0, Statsoft Inc., Tulsa, EUA).

Os modelos foram ajustados por análise de regressão não linear ao método dos mínimos quadrados (MMQ), em um intervalo de confiança de 95%. O *software Statistica* (10.0, Statsoft Inc., Tulsa, EUA) foi utilizado para realizar os ajustes dos modelos. A soma dos quadrados dos resíduos (SQR), Equação 14, e os coeficientes de determinação (R^2) e de determinação ajustado (R^2_{adjusted}) foram utilizados como critério de avaliação da qualidade de ajuste dos modelos.

$$SQR = \sum_{i=1}^N (y_i^{\text{exp}} - y_i^{\text{calc}})^2 \quad (14)$$

Sendo: y_i^{exp} o valor experimental da variável analisada, y_i^{calc} o valor estimado pelos modelos matemáticos para a variável analisada e N o número de observações.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Caracterização físico-química das amostras de soro de leite

Os resultados da caracterização físico-química das amostras de soro são apresentados na Tabela 15. Como podem ser observadas, as amostras de soro apresentaram diferença estatística, entre as espécies, para quase todos os parâmetros investigados. Isto se deve ao fato de que os leites utilizados como matérias-primas originaram-se de diferentes espécies de animais, e, portanto, possuem uma composição nutricional consideravelmente diferente. Além disso, os soros empregados são oriundos de distintos tipos de queijos, os quais apresentam diferenças durante seu processo de fabricação.

TABELA 15 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SORO BOVINO RECONSTITUÍDO E SOROS BOVINO, CAPRINO E BUBALINO FRESCOS.

Parâmetro	Soro bovino reconstituído	Soro de leite bovino	Soro de leite de cabra	Soro de leite de búfala
pH	6,50 ± 0,24 ^a	6,52 ± 0,76 ^{ab}	5,64 ± 0,46 ^b	5,25 ± 0,53 ^b
DQO (g L ⁻¹)*	76,40 ± 1,37 ^c	79,27 ± 1,58 ^c	84,64 ± 2,07 ^b	91,55 ± 1,50 ^a
Turbidez (NTU)	2880,0 ± 190,3 ^c	3155,2 ± 122,5 ^c	3640,7 ± 204,3 ^b	5318,5 ± 224,5 ^a
Proteína (g L ⁻¹)	7,02 ± 0,21 ^c	7,27 ± 0,58 ^c	8,93 ± 0,22 ^b	10,89 ± 0,37 ^a
Lactose (g L ⁻¹)	41,20 ± 0,88 ^c	42,46 ± 1,23 ^c	39,24 ± 0,86 ^b	46,26 ± 0,28 ^a
Lipídios (g L ⁻¹)	2,35 ± 0,15 ^c	2,64 ± 0,32 ^c	3,73 ± 0,61 ^b	4,97 ± 0,54 ^a
Sólidos totais (g L ⁻¹)	57,14 ± 1,07 ^c	56,21 ± 1,96 ^c	59,16 ± 0,80 ^b	66,97 ± 1,44 ^a
Ca (mg kg ⁻¹)	298,35 ± 7,95 ^d	319,27 ± 2,53 ^c	448,67 ± 12,84 ^b	949,90 ± 17,49 ^a
P (mg kg ⁻¹)	320,98 ± 7,76 ^d	338,02 ± 3,69 ^c	443,02 ± 14,69 ^b	679,68 ± 21,70 ^a
K (mg kg ⁻¹)	838,73 ± 10,25 ^d	1576,06 ± 7,94 ^b	2170,38 ± 85,31 ^a	1293,78 ± 55,51 ^c
Na (mg kg ⁻¹)	178,08 ± 1,60 ^d	240,44 ± 1,09 ^c	289,87 ± 9,56 ^b	345,73 ± 13,16 ^a

Valores são médias ± desvio padrão.

Letras diferentes na mesma linha denotam diferença de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

*DQO: demanda química de oxigênio

O leite de búfala tem uma composição tradicionalmente conhecida como superior aos demais tipos de leite, principalmente em relação aos teores de gorduras, proteínas, lactose e minerais e, conseqüentemente, possui maior teor de sólidos totais e DQO (SHAKERIAN et al., 2016). Assim, o soro de leite gerado na fabricação de queijo *mozzarella* de búfala também apresenta composição nutricional superior aos demais tipos de soro. Além do teor de proteínas, lactose e lipídios, a

composição dos minerais também foi superior quando comparada às outras amostras de soro, principalmente o teor de Ca. Esses achados estão de acordo com dados da literatura para leite de búfala que apresentam elevado teor de Ca em relação ao leite de vaca (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2011; MEDHAMMAR et al., 2012; SHAKERIAN et al., 2016).

A composição do soro de leite de cabra foi semelhante ao encontrado na literatura para este tipo de soro, com valores de proteína, lactose e sólidos totais muito próximos aos verificados por Thum et al. (2015). As pequenas diferenças observadas, em relação à literatura, podem ser resultado do leite utilizado e até mesmo do processo que gerou o soro, já que no presente estudo foi utilizado o soro oriundo do processamento do queijo *feta* e Thum et al. (2015) avaliaram soro obtido da fabricação de queijo *camembert*.

Comparando-se os dois soros de leite bovino, identificados como soro bovino reconstituído e soro de leite bovino, verificou-se que ambos possuem composição semelhante, apresentando diferença estatística entre eles apenas para os minerais quantificados. Os valores encontrados para pH, proteína, lactose e sólidos totais estão de acordo com os de outros autores, como os observados para caracterização do soro doce usado por Marx & Kulozik (2018). O valor da DQO também está de acordo com o que foi relatado na literatura, onde são apresentados valores acima de 60 g L^{-1} (SMITHERS, 2015).

Os resultados obtidos para todas as amostras destacam a importância da recuperação e utilização dos nutrientes do soro, principalmente devido ao seu rico conteúdo de proteínas, lactose e minerais. Além de evidenciar a relevância da aplicação de processos que visem à mitigação de seu impacto ambiental, reduzindo parâmetros como turbidez e DQO.

2.3.2 Processo de ultrafiltração do soro bovino reconstituído

O delineamento experimental 2^2 com configuração em estrela e três pontos centrais é mostrado na Tabela 16. A influência das variáveis de operação, ou seja, temperatura e pressão transmembrana, no desempenho do processo de separação

por ultrafiltração foi analisada e resultou em diferentes teores de proteína na corrente concentrada para a amostra de soro de leite reconstituído.

TABELA 16 - MATRIZ DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR).

Ensaio	T (°C)	ΔP (kPa)	Concentração de proteínas no concentrado (g L ⁻¹)
1	20 (-1)	20 (-1)	28,03 ± 0,22 ^F
2	40 (1)	20 (-1)	27,75 ± 0,09 ^F
3	20 (-1)	60 (1)	34,32 ± 0,37 ^C
4	40 (1)	60 (1)	36,73 ± 0,29 ^A
5	16 (-1,41)	40 (0)	29,67 ± 0,25 ^E
6	44 (1,41)	40 (0)	33,18 ± 0,31 ^D
7	30 (0)	10 (-1,41)	27,47 ± 0,14 ^G
8	30 (0)	70 (1,41)	35,56 ± 0,26 ^B
9	30 (0)	40 (0)	35,78 ± 0,68 ^{AB}
10	30 (0)	40 (0)	36,02 ± 0,50 ^{AB}
11	30 (0)	40 (0)	35,94 ± 0,52 ^{AB}

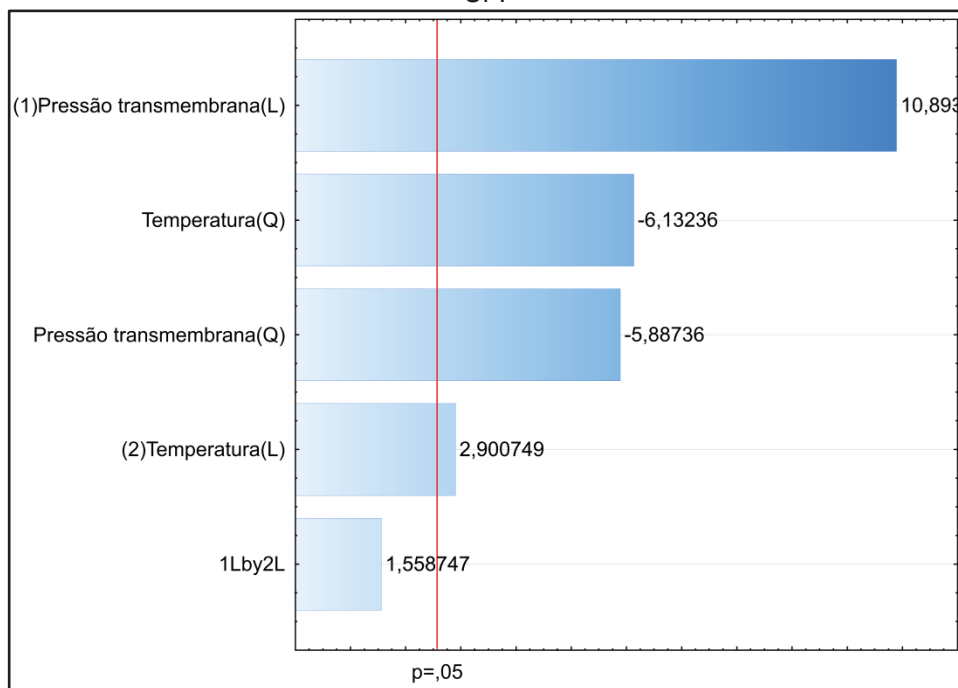
Valores são médias ± desvio padrão.

Letras diferentes denotam diferença estatística de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

Quanto ao teor de proteína, verificou-se que após a UF o valor variou entre 27,47 e 36,73 g L⁻¹. O maior valor foi observado no ensaio 4, que utilizou os dois fatores no nível 1, temperatura de 40 °C e pressão de 60 kPa, enquanto a menor concentração foi observada no ensaio 7, que utilizou temperatura no ponto central (30 °C) e menor nível de pressão (10 kPa). Os experimentos realizados no ponto central (30 °C e 40 kPa) também demonstraram valores expressivos de conteúdo proteico, os quais foram considerados estatisticamente iguais ao ensaio 4 e ensaio 8 (30 °C e 70 kPa). Os resultados sugerem que condições de pressão e temperatura mais baixas, como 10-20 kPa e 16-20 °C, usadas neste estudo, não favorecem a recuperação de proteínas.

O diagrama de Pareto, Figura 9, que mostra a contribuição efetiva de cada parâmetro para a concentração de proteínas, corrobora com esses achados. Nota-se que ambos os termos lineares das variáveis analisadas tiveram um efeito positivo na concentração de proteínas. Ou seja, um aumento na pressão ou temperatura aumenta o conteúdo de proteína no concentrado. No entanto, percebe-se que o efeito da variável pressão é consideravelmente mais expressivo. Possivelmente, isso ocorre porque a pressão é a força motriz por trás do processo, logo seu aumento é mais favorável ao processo.

FIGURA 9 - DIAGRAMA DE PARETO COM O EFEITO ESTIMADO DAS VARIÁVEIS NO PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO BOVINO RECONSTITUÍDO POR UF.



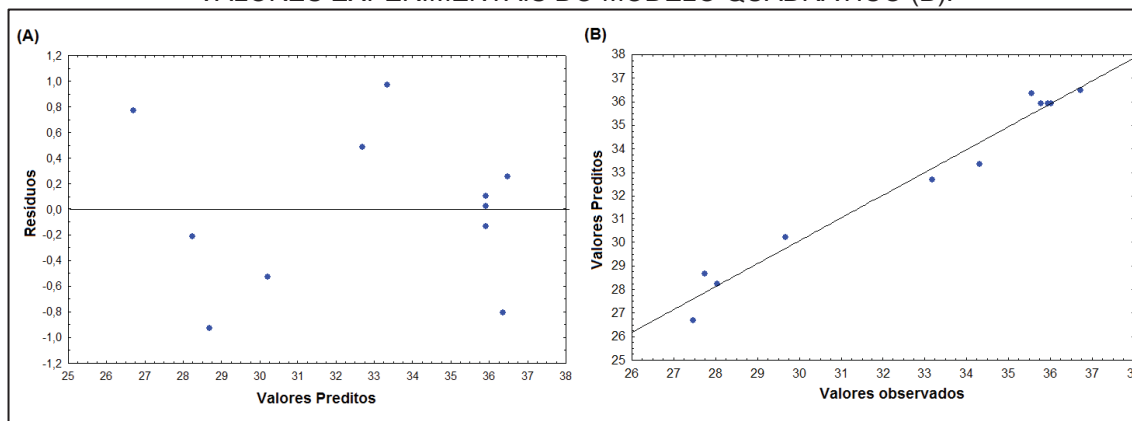
Fonte: A autora (2020).

O modelo de segunda ordem proposto, Equação 16, que prevê a concentração de proteínas em função da pressão transmembrana e temperatura, foi obtido pelos coeficientes de regressão, considerando apenas os termos significativos. A avaliação do modelo foi realizada por meio da análise de resíduos (Figura 10 – A) e do gráfico de valores preditos *versus* valores observados (Figura 10 – B). A significância estatística do modelo foi avaliada através do teste de ANOVA com 95% de confiança (Tabela 17).

$$z = 2.5236 + 0.4498 x - 0.0049 x^2 + 1.3224 y - 0.0228 y^2 \quad (16)$$

Sendo: z a concentração de proteína de soro de leite (g L^{-1}), x é a pressão transmembrana (kPa) e y é a temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

FIGURA 10 - GRÁFICO DOS RESÍDUOS (A), GRÁFICO DOS VALORES PREDITOS VERSUS VALORES EXPERIMENTAIS DO MODELO QUADRÁTICO (B).



Fonte: A autora (2020).

TABELA 17 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA).

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	135,54	4	33,89	36,84	4,53
Resíduos	5,53	6	0,92		
Falta de ajuste	1,81	1	1,81	2,44	6,61
Erro puro	3,72	5	0,74		
Total	141,08	10			

Fonte: A autora (2020).

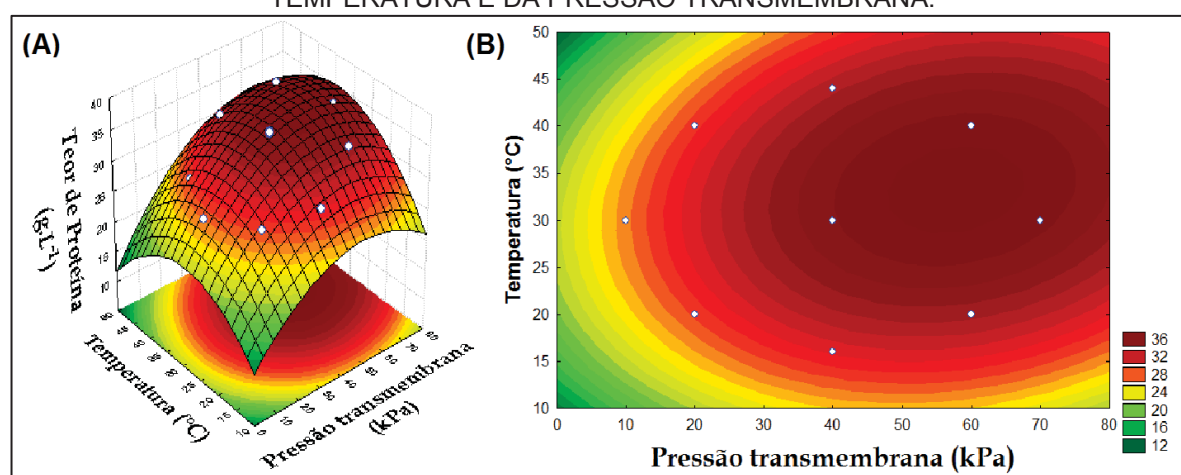
O valor de F_{calc} (36,84) para a regressão foi maior do que o valor de F_{tab} (4,53). Através do teste F, pode-se dizer que a regressão foi significativa ($F_{calc} > F_{tab}$) e o modelo é considerado válido ao nível de 95 % de confiança. Segundo Barros et al. (1995), para que a regressão não seja apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor de F_{calc} dever ser no mínimo de quatro a cinco vezes o valor do F_{tab} , como verificado para esta regressão.

Outra relação importante para observar a validade do modelo é o F_{calc} (2,44) entre a falta de ajuste e o erro puro ser inferior ao valor do F_{tab} (6,61). O F da falta de ajuste em relação ao erro puro deve apresentar o menor valor possível, pois elevado valor de F indica que há uma grande falta de ajuste dos dados ao modelo obtido (BOX; WETZ, 1973). Além disso, o valor de $R^2 = 0,97$ indica que o modelo explicou 97% da variação dos dados observados.

Após esta avaliação, o modelo foi então utilizado para gerar a superfície de resposta (MSR) e o diagrama de contorno Figura 11 (A) e (B), respectivamente.

Como pode ser visto, as condições experimentais na faixa de 40 a 75 kPa e de 25 a 40 °C foram as melhores para a concentração das proteínas de soro de leite. A condição crítica, prevista pelo delineamento experimental, foi em torno de 58 kPa e 33 °C, e o máximo valor predito para a concentração de proteínas foi de 37,48 g L⁻¹. Experimentos foram realizados para validação externa do modelo usando valores ótimos das variáveis e o erro absoluto (5,46%) verificado indica que o modelo é adequado para prever a concentração de proteína, na região experimental avaliada.

FIGURA 11 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (A) E CURVA DE CONTORNO (B) PARA CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO BOVINO RECONSTITUÍDO COMO FUNÇÃO DA TEMPERATURA E DA PRESSÃO TRANSMEMBRANA.



Fonte: A autora (2020).

2.3.2.1 Rejeição das proteínas do soro de leite bovino reconstituído

Como podem ser observados na Tabela 18, os coeficientes de rejeição (CR) também foram calculados para os ensaios do delineamento experimental e apresentaram valores acima de 81,83% para todas as condições estudadas.

TABELA 18 - COEFICIENTES DE REJEIÇÃO OBTIDOS PARA OS ENSAIOS DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.

Ensaio	T (°C)	ΔP (kPa)	Coeficiente de rejeição, CR (%)
1	20	20	85,93 ± 0,76 ^F
2	40	20	84,84 ± 0,55 ^F
3	20	60	90,03 ± 0,23 ^C
4	40	60	92,62 ± 0,66 ^A
5	16	40	87,02 ± 0,12 ^E
6	44	40	88,39 ± 0,36 ^D
7	30	10	81,83 ± 0,23 ^G
8	30	70	90,16 ± 0,88 ^{BC}
9	30	40	91,39 ± 0,72 ^{AB}
10	30	40	91,67 ± 0,67 ^{AB}
11	30	40	91,12 ± 0,86 ^{AB}

Valores são médias ± desvio padrão.

Letras diferentes denotam diferença estatística de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

Estes resultados confirmam que a membrana utilizada foi adequada para a retenção de proteínas do soro e também estão de acordo com os achados da literatura. No estudo de Ilchenco et al. (2018), a UF com membrana de 10 kDa também mostrou ser capaz de fornecer alta retenção de proteínas, sendo verificada CR de 80,48% quando empregadas as condições de 10 °C e 2 bar.

O processo de ultrafiltração também foi empregado por Chollangi e Hossain (2007) para a separação das proteínas e lactose presentes na solução de soro de leite sintético. Os autores testaram membranas de celulose de 3, 5 e 10 kDa, obtendo melhores resultados quando a membrana de 10 kDa. A boa retenção obtida pela membrana empregada no presente estudo pode ser explicada pelo fato de que as principais proteínas do soro, β-Lg e α-La, possuem 18 e 14 kDa, respectivamente, ou seja, valores superiores à massa molar de corte da membrana.

Apesar dos resultados satisfatórios verificados nesta etapa do estudo e do modelo obtido prever adequadamente a concentração de proteínas do soro, a análise de parâmetros do processo, como o fluxo permeado, também é fundamental durante o processo de UF. O fluxo de permeado é um parâmetro crítico, portanto, sua análise e a compreensão dos fenômenos que podem estar associados ao seu desempenho são indispensáveis para a viabilidade do processo. Portanto, além dos parâmetros concentração de proteínas e coeficiente de rejeição, o fluxo de permeado também foi avaliado e seus resultados são apresentados no subitem a seguir.

2.3.2.2 Fluxo de permeado

A Tabela 19 apresenta os valores finais do fluxo de permeado para o processo UF do soro de leite reconstituído. Observa-se que os ensaios 6, 9 10 e 11 resultaram em maior fluxo de permeado, com valor em torno de $8,5 \text{ kg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, e estatisticamente iguais. Note-se que estes ensaios correspondem às condições de pressão e temperatura intermediárias.

TABELA 19 - FLUXOS DE PERMEADO OBTIDOS PARA OS ENSAIOS DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.

Ensaio	T (°C)	ΔP (kPa)	Fluxo de permeado ($\text{kg m}^{-2} \text{ h}^{-1}$)
1	20	20	$3,7 \pm 0,09$ ^F
2	40	20	$4,0 \pm 0,11$ ^E
3	20	60	$6,8 \pm 0,06$ ^D
4	40	60	$7,0 \pm 0,12$ ^C
5	16	40	$7,2 \pm 0,07$ ^B
6	44	40	$8,5 \pm 0,22$ ^A
7	30	10	$3,2 \pm 0,04$ ^G
8	30	70	$7,4 \pm 0,23$ ^B
9	30	40	$8,5 \pm 0,34$ ^A
10	30	40	$8,3 \pm 0,17$ ^A
11	30	40	$8,6 \pm 0,20$ ^A

Valores são médias \pm desvio padrão.

Letras diferentes denotam diferença estatística de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

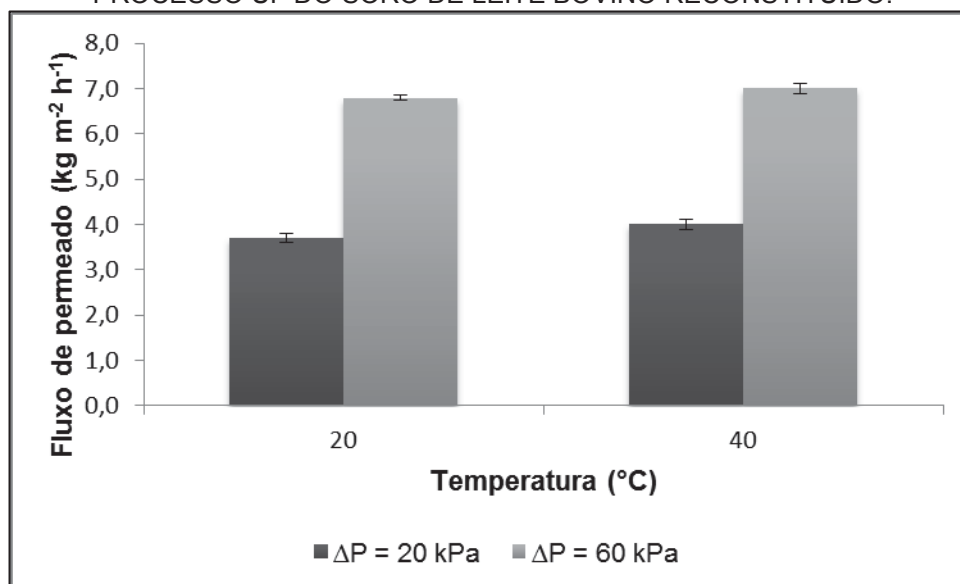
Os resultados obtidos para o fluxo de permeado indicam que a temperatura é um fator que contribui de forma discreta, mas positivamente, para o processo de UF, ou seja, seu aumento gera um ligeiro acréscimo no fluxo de permeado. O fato de temperaturas mais altas favorecerem a difusão e, portanto, a transferência de massa, pode explicar o aumento do fluxo durante o processo de UF. Além disso, o aumento da temperatura reduz a viscosidade da solução de soro de leite, o que também favorece a transferência de massa e ajuda a aumentar o fluxo de permeado.

No entanto, o efeito benéfico da temperatura sobre o fluxo de permeado somente é verificado durante o processo de UF a pressões mais baixas, como nos ensaios 1 e 2, por exemplo, realizados a 20 kPa. Uma vez que os ensaios 9 e 6, ambos a 40 kPa, não apresentam diferença significativa no valor de fluxo ao aumentar a temperatura de 30 para 44 °C, respectivamente.

Além disso, a precipitação das proteínas ocasionada por temperaturas elevadas também pode influenciar o fluxo de permeado. Konrad et al. (2012) descobriram que um aumento na temperatura acima dos 50 °C resulta em considerável declínio do fluxo, possivelmente devido à precipitação térmica das proteínas do soro, especialmente α -La.

Em relação ao efeito da pressão transmembrana, quanto maior a ΔP utilizada, maior é o fluxo de permeado. Os ensaios 1 e 3 (mesma temperatura = 20 °C) e 2 e 4 (mesma temperatura = 40 °C), como pode ser observado na Tabela 19, representam este comportamento. Além disso, observou-se que o efeito da temperatura é menos expressivo para o aumento do fluxo de permeado do que o efeito da pressão transmembrana, Figura 12. Comparando os testes realizados a uma temperatura fixa de 40 °C, variando a pressão de 20 a 60 kPa, há um aumento de aproximadamente 80% no fluxo permeado. Em relação ao efeito da temperatura, comparando os experimentos realizados a 20 e 40 °C, em um valor fixo de 60 kPa, houve um aumento de cerca de 6% no valor do fluxo.

FIGURA 12 - EFEITO DA TEMPERATURA E ΔP NO FLUXO DE PERMEADO DURANTE O PROCESSO UF DO SORO DE LEITE BOVINO RECONSTITUÍDO.



Fonte: A autora (2020).

Como a pressão é a força motriz do processo de ultrafiltração, à medida que a diferença de pressão através da superfície da membrana aumenta, o fluxo também aumenta. Estes comportamentos de pressão são semelhantes aos obtidos por Baldasso, Barros e Tessaro (2011) e Galanakis et al. (2014), que variaram a pressão

transmembrana de 0,8 a 4 bar e observaram um aumento no fluxo de permeado enquanto estudavam a UF para recuperação de proteína de soro em pó e de soro de queijo *Halloumi*, respectivamente.

Nath et al. (2014) também observaram um aumento no fluxo de permeado à medida que a ΔP aumentava durante o processo de ultrafiltração do soro de leite. No entanto, os autores apontaram que este comportamento foi verificado apenas até certo valor de pressão, possivelmente devido ao efeito da camada polarizada em alta ΔP . Os achados deste trabalho também são consistentes a esse respeito, uma vez que os ensaios 3 e 4 (60 kPa) e o ensaio 8 (70 kPa), da Tabela 19, resultaram em menor fluxo de permeado quando comparado aos valores obtidos a 40 kPa. Este comportamento pode ser devido ao fato de que, com maior força motriz, mais moléculas de soluto são transportadas para as superfícies da membrana, o que resultará em maior deposição e, conseqüentemente, maior resistência da camada polarizada.

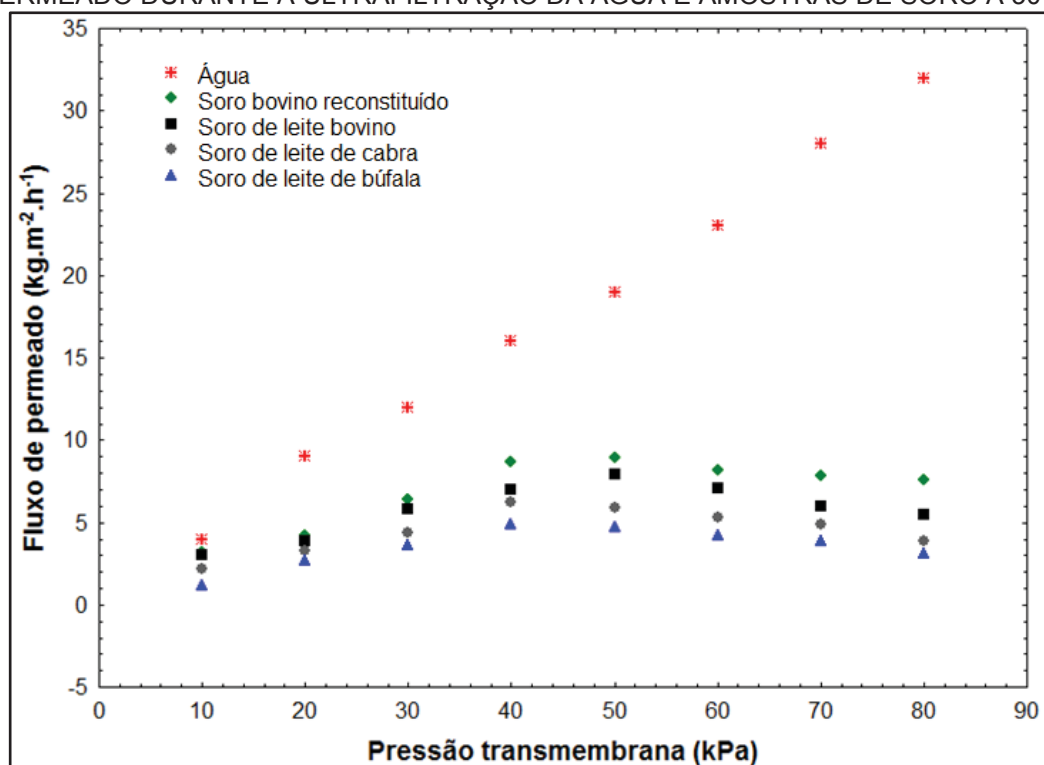
2.3.3 Análise de fluxo de permeado – ensaios de pressão

Como a pressão exerce forte influência no processo de separação, novos experimentos foram conduzidos em laboratório para melhor verificar o comportamento do fluxo permeado frente à variação deste parâmetro. Para isso, a temperatura foi ajustada a 30 °C e ΔP variou de 10 a 80 kPa. Esta etapa do estudo foi realizada para todas as amostras. A Figura 13 mostra a variação no fluxo de permeado para água pura e para cada amostra de soro de leite (soro bovino reconstituído e soros frescos de origem bovina, caprina e bubalina) para as diferentes pressões aplicadas.

Como pode ser verificado, o aumento na ΔP proporcionou um aumento linear no fluxo de água. Para as amostras de soro, foi observado um aumento linear no fluxo de permeado apenas na região de baixas pressões, verificado até 40 kPa, seguido por uma ligeira diminuição no fluxo nas pressões mais altas. O comportamento de declínio deve-se ao fato de que a elevada ΔP intensifica os fenômenos de polarização por concentração e *fouling*, resultando em um fluxo de permeado menor. Assim, nos valores de ΔP mais baixos, o fluxo de permeado foi

controlado pela pressão, enquanto que, nos valores mais elevados, a transferência de massa controla o processo de UF.

FIGURA 13 - EFEITO DA PRESSÃO TRANSMEMBRANA NO COMPORTAMENTO DO FLUXO DE PERMEADO DURANTE A ULTRAFILTRAÇÃO DA ÁGUA E AMOSTRAS DE SORO A 30 °C.



Fonte: A autora (2020).

Comportamentos como esse já foram relatados na literatura. Macedo, Duarte e Fragoso (2015), durante o estudo UF do soro de leite ovino, observaram o fluxo de permeado próximo ao fluxo de água pura, durante pressões mais baixas, e distante do fluxo de água em pressões mais elevadas. Os autores sugerem que esse comportamento é provavelmente uma consequência do controle do processo de UF pelo fenômeno de polarização por concentração, o qual é, normalmente, muito sutil em baixas pressões e se torna cada vez mais importante à medida que a pressão aumenta.

Comparando o fluxo de permeado para as quatro diferentes amostras de soro, verificou-se que as amostras de soro de leite bovino, reconstituído e fresco, obtiveram melhores resultados a 50 kPa, com valores de 8,9 e 7,9 $\text{kg m}^{-2} \text{h}^{-1}$, respectivamente, ligeiramente superiores aos observados para pressão de 40 kPa, que foram 8,7 e 7,1 $\text{kg m}^{-2} \text{h}^{-1}$, respectivamente. As amostras de soro de leite de cabra e de búfala resultaram em fluxo máximo a 40 kPa, com valores de 6,2 e 4,9 $\text{kg m}^{-2} \text{h}^{-1}$.

$\text{m}^2 \text{h}^{-1}$, respectivamente. Provavelmente, estes valores mais baixos são devidos à presença de solutos em maior concentração nas amostras caprina e bubalina. Destaca-se o maior teor de proteínas destas amostras em comparação com as demais, o que pode ter contribuído fortemente para a ocorrência de fenômenos resistivos ao fluxo.

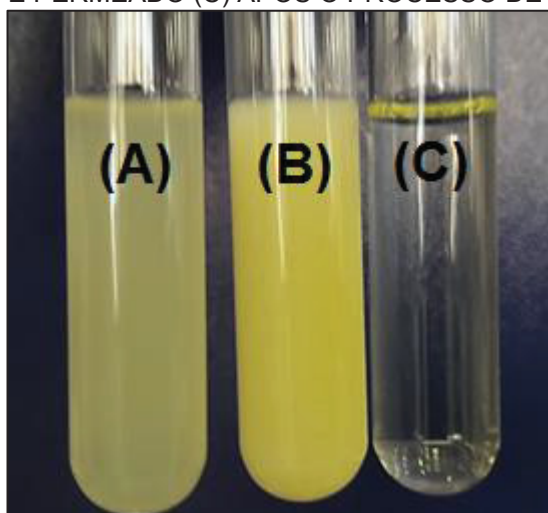
O menor fluxo de permeado observado para as amostras de soro de leite de cabra e búfala também pode ser explicado pelo alto conteúdo de cálcio, 448,67 e 949,90 mg kg^{-1} , respectivamente. De acordo com Barukčić, Božanić e Kulozik (2015), a influência do cálcio foi determinante para a diminuição do fluxo permeado no estudo da UF do soro doce, possivelmente devido à incrustação resultante da interação entre as proteínas e o mineral.

Embora as amostras de soro de leite de cabra e búfala tenham apresentado valores de fluxo maiores quando a ΔP de 40 kPa foi empregada, optou-se por avaliar o processo de batelada a 50 kPa. Essa decisão foi tomada porque a redução no fluxo observada para essas amostras, quando se aumentou a ΔP de 40 para 50 kPa, foi relativamente pequena e não comprometeu consideravelmente o processo. Além disso, as condições selecionadas para avaliar o processo de batelada para todas as amostras de soro, 30 °C e 50 kPa, são mais próximas daquelas que resultam na maior concentração de proteínas previstas pelo delineamento experimental (40 °C e 60 kPa).

2.3.4 Processo de UF em modo batelada

O processo de ultrafiltração realizado em batelada resultou em permeado com elevada remoção da turbidez (Tabela 20), ou seja, foi possível a obtenção de um líquido livre de materiais suspensos, como pode ser verificado visualmente na Figura 15. Este resultado é devido à retenção das proteínas pela membrana, uma vez que estas também são responsáveis pela opalescência e consistência do soro. Após a UF, redução no valor de DQO acima de 50% também foi obtida para todos os permeados. A razão para isso é a concentração elevada de proteína e retenção parcial da lactose. Essas características observadas nos permeados tendem a facilitar sua aplicação em futuros produtos ou tratamentos para seu descarte.

FIGURA 14 - AMOSTRA DE SORO DE LEITE BOVINO ANTES DA UF (A) E AMOSTRAS DE CONCENTRADO (B) E PERMEADO (C) APÓS O PROCESSO DE UF, A 30 °C E 50 kPa.



Fonte: A autora (2020).

TABELA 20 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS SOROS, CONCENTRADOS E PERMEADOS OBTIDOS DO PROCESSO DE UF, A 30 °C E 50 kPa.

Amostras		Turbidez (NTU)*	DQO (g L ⁻¹)**	Proteína (g L ⁻¹)	Lactose (g L ⁻¹)
Soro bovino reconstituído	Soro	2880,0 ± 190,30	76,40 ± 1,37	7,02 ± 0,21	41,20 ± 0,88
	Concentrado	12327,06 ± 108,39	n.a.	35,26 ± 0,93	22,56 ± 0,45
	Permeado	n.s.	30,25 ± 1,53	0,61 ± 0,10	18,45 ± 0,51
Soro de leite bovino	Soro fresco	3155,22 ± 122,51	79,27 ± 1,58	7,27 ± 0,58	42,46 ± 1,23
	Concentrado	14165,63 ± 98,44	n.a.	36,74 ± 1,02	21,65 ± 0,55
	Permeado	n.s.	33,55 ± 2,07	0,42 ± 0,08	20,44 ± 0,37
Soro de leite de cabra	Soro fresco	3640,73 ± 204,34	84,64 ± 2,70	8,93 ± 0,22	39,24 ± 0,86
	Concentrado	17375,26 ± 137,56	n.a.	39,74 ± 1,25	20,36 ± 0,58
	Permeado	n.s.	40,86 ± 1,97	0,21 ± 0,05	17,53 ± 0,34
Soro de leite de búfala	Soro fresco	5318,52 ± 224,50	91,55 ± 1,50	10,89 ± 0,37	46,26 ± 0,28
	Concentrado	20420,08 ± 154,96	n.a.	43,76 ± 2,70	24,52 ± 0,29
	Permeado	n.s.	43,37 ± 2,66	0,19 ± 0,06	21,84 ± 0,76

* n.s.: não significativo (valor ≤ 3 NTU).

** n.a.: não analisado.

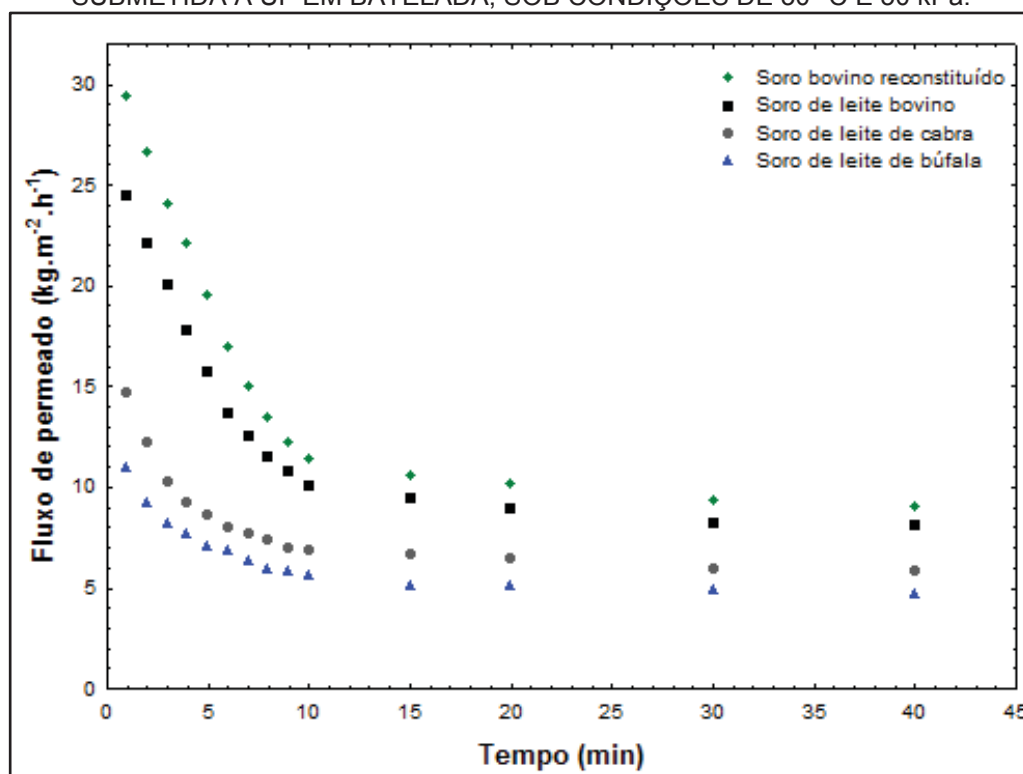
Concentrados com alto teor de proteína foram obtidos para todas as amostras estudadas. Após o processo de ultrafiltração, as amostras foram liofilizadas (-50°C, 70 µmHg, durante 40 h) e resultaram em concentrados em pó com teor de proteína de 59,4, 61,3, 64,2 e 70,8%, para o soro bovino reconstituído e soros frescos de origem bovina, caprina e bubalina, respectivamente. Segundo Brans et al. (2004) e USDA (2013), para o produto ser considerado como concentrado proteico de soro de leite (WPC), ele deve ter um teor de proteína na faixa de 35 a 80%. Estes WPC

podem ser usados para obter vários produtos, tais como bebidas, sobremesas e produtos de panificação, contribuindo não só para o seu valor nutricional, mas também para os benefícios para a saúde e para melhorar as características tecnológicas (GAJO ET AL., 2017; SAHAGÚN, BRAVO-NÚÑEZ, BÁSCONES, & GÓMEZ, 2018; TORRES et al., 2018).

A lactose, que em teoria deveria passar integralmente pela membrana devido a sua massa molecular de 342,3 Da, permeou a membrana apenas de forma parcial. Este comportamento ocorre possivelmente pelo rápido bloqueio dos poros da membrana no início do processo de UF, provocado pelas proteínas do soro, o que dificulta a permeação inclusive de moléculas menores, como é o caso da lactose do soro de leite.

No processo em batelada também se avaliou o comportamento do fluxo de permeado. A Figura 15 mostra a evolução do fluxo de permeado com o tempo para cada amostra de soro.

FIGURA 15 - FLUXO DE PERMEADO VERSUS TEMPO PARA CADA AMOSTRA DE SORO SUBMETIDA À UF EM BATELADA, SOB CONDIÇÕES DE 30 °C E 50 kPa.



Fonte: A autora (2020).

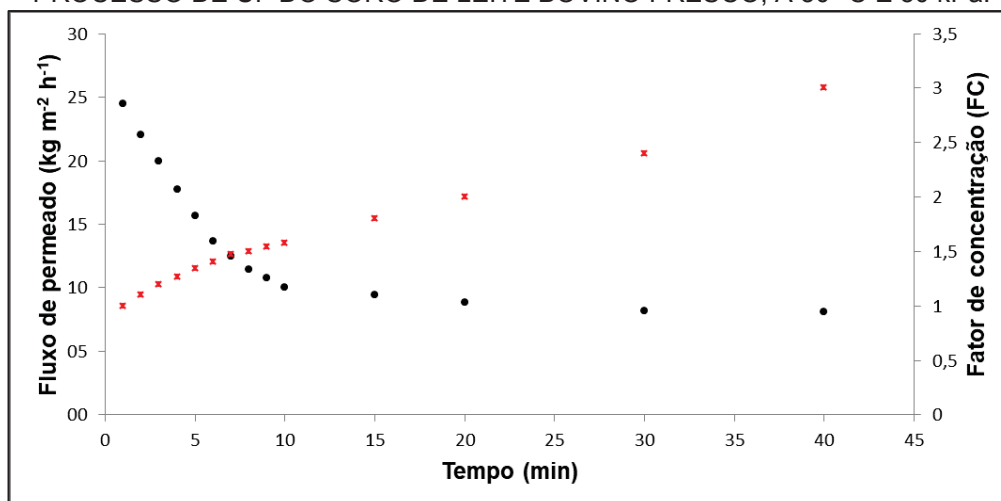
Como observado, houve uma queda abrupta no fluxo de permeado, seguido por um declínio gradual e subsequente estabilização após cerca de 10 min do

processo para todas as amostras. Esse comportamento ocorre pelo fato de que no curso do processo há uma redução no volume da alimentação devido à remoção da corrente de permeado, promovendo a concentração de proteína, o que resulta em uma incrustação mais severa da membrana e um aumento na camada de polarização.

Segundo Ng, Haribabu, Harvie, Dunstan, & Martin (2017), que pesquisaram sobre a ultrafiltração de leite desnatado, o desempenho do processo de UF é severamente reduzido pelo declínio no fluxo resultante da camada de polarização e do *fouling*, cujos mecanismos ainda não são totalmente compreendidos. No entanto, o que se sabe é que o *fouling* é causado predominantemente por proteínas do soro e, em alguns casos, por minerais. Ao comparar as amostras de soro estudadas no presente estudo, confirmou-se que o menor fluxo observado foi para a amostra de soro de leite de búfala, que apresentou os maiores valores tanto para o teor de proteínas quanto de cálcio.

A partir dos valores obtidos para o fluxo de permeado e fator de concentração do soro de leite, construíram-se as curvas ilustradas pela Figura 16. Observaram-se comportamentos semelhantes nas curvas obtidas para as demais amostras, e por isso, optou-se por mostrar apenas o soro de leite bovino fresco como exemplo.

FIGURA 16 - PERFIL DO FLUXO DE PERMEADO E FATOR DE CONCENTRAÇÃO AO LONGO DO PROCESSO DE UF DO SORO DE LEITE BOVINO FRESCO, A 30 °C E 50 kPa.



Fonte: A autora (2020).

Nota-se, que houve acentuada queda no fluxo de permeado, seguida por um declínio gradual e posterior estabilização logo após 10 min de UF, resultando em fluxo final reduzido em aproximadamente 67 % em relação ao inicial. No decorrer do

processo, ocorre redução da massa de alimentação devido à remoção da corrente de permeado, portanto, o fator de concentração aumenta ao longo do tempo. Durante o período de avaliação do ensaio cinético, o fator de concentração máximo obtido foi de aproximadamente 3,0, correspondendo à remoção de cerca de 65 % da massa inicial de alimentação do soro de leite. Observa-se ainda que, apesar do contínuo aumento do FC, este já não mais interfere no fluxo, ou seja, foi possível conduzir o processo em batelada com remoção do permeado e mesmo assim manter o fluxo constante ao longo do tempo.

Com relação à análise das resistências, os dados apresentados pela Tabela 21 demonstram que tanto a polarização por concentração quanto o fenômeno de *fouling* são responsáveis por grande parte da resistência total do processo de ultrafiltração do soro de leite. Em termos percentuais, a resistência devido à polarização é responsável por maior parcela da resistência total, contribuindo com 44,5, 46,0 e 45,5%, para as amostras de soro reconstituído, soro de leite bovino e caprino, respectivamente.

Como o efeito resistivo ao *fouling* está diretamente relacionado com a composição da amostra de soro, na ultrafiltração do soro de leite de búfala a R_f apresentou maior contribuição à resistência total, com percentual de 45,5%.

A resistência intrínseca à membrana pode ser considerada constante, já que esta é determinada no início dos ensaios de ultrafiltração, utilizando-se apenas água e operando com a membrana limpa.

TABELA 21 - VALORES ESTIMADOS DAS RESISTÊNCIAS DO PROCESSO DE UF DAS AMOSTRAS DE SORO.

Resistência ($\text{m}^2 \text{kg}^{-1} \times 10^{-4}$)	Soro bovino reconstituído	Soro de leite bovino	Soro de leite de cabra	Soro de leite de búfala
Intrínseca à membrana (R_m)	1,43	1,44	1,45	1,44
Devido ao <i>fouling</i> (R_f)	3,65	4,11	4,94	5,97
Devido à polarização (R_p)	4,07	4,73	5,34	5,72
Total (R_t)	9,15	10,28	11,73	13,13

Fonte: A autora (2020).

2.3.5 Avaliação do fluxo de permeado pelos modelos matemáticos

Para identificar o mecanismo de *fouling* predominante durante a ultrafiltração do soro, adotou-se um estudo comparativo entre os valores experimentais do fluxo de permeado e os diferentes modelos matemáticos. O coeficiente de determinação (R^2), o coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adjusted}) e a soma dos quadrados dos resíduos (SQR) entre previsões numéricas e dados experimentais foram os critérios utilizados para a escolha do modelo de melhor ajuste para cada ensaio avaliado, Tabela 22.

TABELA 22 - MODELAGEM DOS DADOS DE FLUXO DE PERMEADO.

Modelos	Parâmetros	Soro bovino reconstituído	Soro de leite bovino	Soro de leite de cabra	Soro de leite de búfala
Bloqueio completo de poros (n=2)	R^2 (%)	81,2	83,4	93,7	92,6
	R^2_{adjusted} (%)	80,6	82,3	91,9	91,2
	SQR	197,16	120,36	23,39	27,70
Bloqueio interno de poros (n=1,5)	R^2 (%)	90,4	85,8	89,2	91,6
	R^2_{adjusted} (%)	89,6	84,6	88,7	90,8
	SQR	93,36	104,84	71,35	45,56
Bloqueio parcial de poros (n=1,0)	R^2 (%)	80,3	78,9	81,9	90,7
	R^2_{adjusted} (%)	79,4	78,1	80,8	89,5
	SQR	107,24	150,45	101,38	63,39
Torta filtrante (n=0)	R^2 (%)	95,5	94,4	96,8	96,6
	R^2_{adjusted} (%)	94,8	93,7	95,9	95,5
	SQR	12,93	31,01	5,68	7,43
Ho-Zydney	R^2 (%)	98,8	98,2	99,0	99,4
	R^2_{adjusted} (%)	98,1	97,6	98,5	98,9
	SQR	3,36	3,59	2,52	1,57

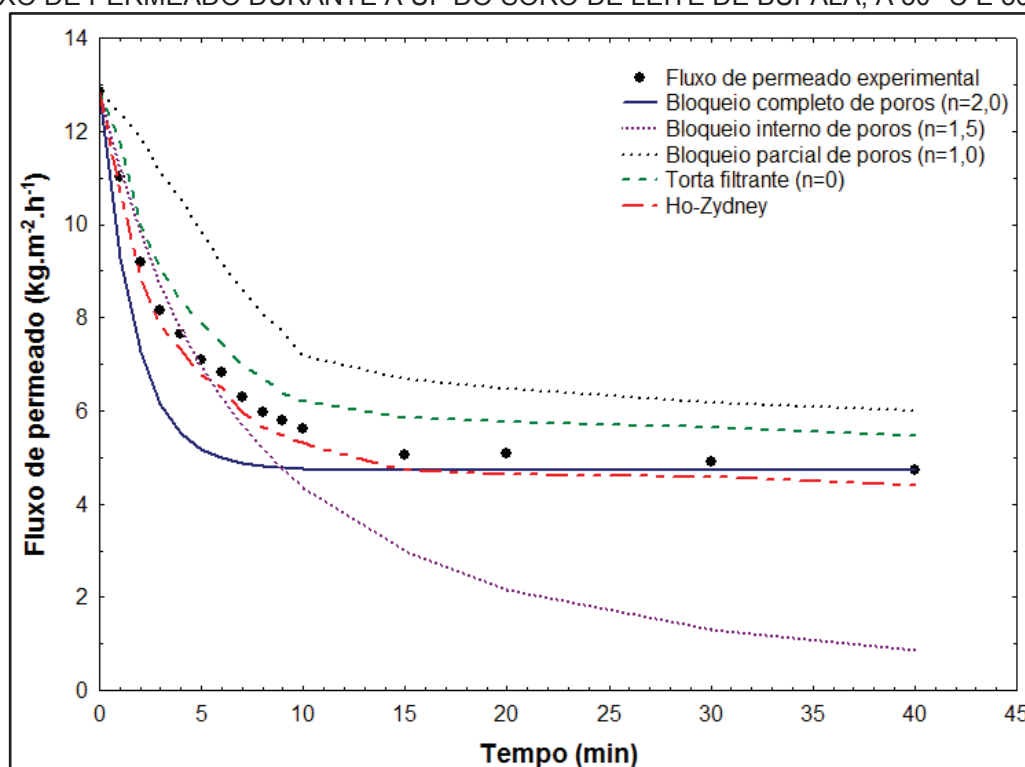
Fonte: A autora (2020).

Verificou-se que dentre os modelos convencionais, o modelo de torta filtrante foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais de fluxo para todos os soros de leite. Resultados semelhantes foram reportados por Luján-Facundo et al. (2017), que estudaram o fenômeno de *fouling* durante UF de diferentes soluções modelo de proteína. Os autores relataram que o modelo de torta filtrante foi o que melhor se ajustou aos dados de fluxo para a solução testada. No entanto, nenhum dos modelos estudados definiu com precisão o comportamento do processo de UF para todas as soluções testadas pelos autores.

No presente trabalho, apesar dos bons resultados apresentados, os modelos tradicionais de bloqueio de poros também não descreveram completamente o comportamento do fluxo de permeado, o que foi possível com o modelo de Ho e Zydney. Este modelo considera o *fouling* como um processo de dois estágios com o bloqueio dos poros ocorrendo antes da acumulação de um depósito na superfície da membrana. Assim, pode-se dizer que este modelo combina os modelos de bloqueio de poros e torta filtrante, e a resistência devido ao bloqueio dos poros inicialmente domina a ultrafiltração do soro, enquanto a resistência devida ao acúmulo na superfície da membrana se torna mais expressiva no final do processo.

A Figura 17 mostra o ajuste dos quatro modelos tradicionais de bloqueio de poros e do modelo de Ho-Zydney para amostra de soro de leite de búfala.

FIGURA 17 - AJUSTE DOS MODELOS DE BLOQUEIO DE POROS E HO-ZYDNEY AOS DADOS DE FLUXO DE PERMEADO DURANTE A UF DO SORO DE LEITE DE BÚFALA, A 30 °C E 50 kPa.



Fonte: A autora (2020).

Segundo os autores do modelo, Ho e Zydney (2000), a vantagem deste modelo é que ele elimina a necessidade de usar equações diferentes para descrever os dois fenômenos que ocorrem durante o *fouling*, uma vez que a equação proposta fornece uma transição suave do bloqueio de poros para o regime de torta filtrante.

Portanto, pode-se inferir, com base no perfil de *fouling* sugerido pelos modelos, que em um primeiro momento do processo as proteínas do soro, especialmente as de tamanho similar a 10 kDa, obstruem os poros da membrana. Enquanto o processo progride, a alta concentração de proteínas na corrente de concentrado leva à polarização por concentração e a interação proteína-proteína tende a formar um gel na superfície da membrana, causando o fenômeno de *fouling*. Outro fator que contribui para o crescimento da camada de obstrução na superfície da membrana, característica do regime de torta filtrante no fenômeno de *fouling*, é possivelmente a interação proteína-cálcio.

2.4 CONCLUSÃO

Neste trabalho, a recuperação das proteínas do soro de leite de diferentes origens, utilizando processo de ultrafiltração, resultou em coeficientes de rejeição de até 92,6% para a membrana aplicada. As melhores condições de operação pelo delineamento experimental utilizado, para concentração das proteínas do soro, foram 60 kPa e 40 °C, resultando em concentração proteica de aproximadamente 37 g L⁻¹, para a amostra de soro bovino reconstituído.

Os resultados mostraram que condições de pressão mais altas favorecem o aumento do fluxo na UF do soro de leite. Porém, este comportamento só é verificado até valores limite, em torno de 40-50 kPa. Os maiores fluxos de permeado, 8,9 e 7,9 kg m⁻² h⁻¹, foram obtidos a 50 kPa e 30 °C, para o soro de leite bovino reconstituído e soro de leite bovino fresco, respectivamente. Além disso, o fluxo de permeado da UF do soro foi fortemente influenciado pelos conteúdos de proteína e cálcio da amostra. Assim, os soros de leite de cabra e búfala resultaram em menor fluxo de permeado durante o processo de ultrafiltração, uma vez que possuem altas concentrações desses componentes.

Após a ultrafiltração em modo de operação batelada e processo de liofilização, foram obtidos WPC com teor de proteína de 59,4, 61,3, 64,2 e 70,8%, respectivamente, para o soro bovino reconstituído e soros frescos de origem bovina, caprina e bubalina.

Além disso, o modelo de Ho e Zydney apresentou maior concordância com os dados experimentais para as condições testadas e demonstrou uma descrição mais

completa do comportamento do *fouling* durante a ultrafiltração de proteína de soro para todas as amostras utilizadas. Isto sugere que o declínio no fluxo de permeado ocorre inicialmente devido ao bloqueio dos poros causado pelas proteínas do soro do leite e, posteriormente, pelo acúmulo dessas proteínas e seus agregados na superfície da membrana.

CAPÍTULO III

**HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA LACTOSE PRESENTE NO SORO DE LEITE:
ENZIMA LIVRE, IMOBILIZADA E PROCESSO INTEGRADO HIDRÓLISE-UF**

RESUMO

O soro de leite, mesmo quando tratado por ultrafiltração para concentrar suas proteínas, ainda possui limitações de aplicação devido ao seu elevado teor de lactose. A intolerância ou má digestão da lactose consiste na redução da capacidade do organismo em hidrolisar esse carboidrato. Logo, a hidrólise enzimática pela ação da β -galactosidase tem sido uma alternativa, que além de possibilitar sua aplicação em produtos destinados à população que sofre de intolerância, também contribui para diminuição do impacto ambiental causado pelo soro. Sendo assim, objetivou-se avaliar o processo de hidrólise da lactose de amostras de soro de leite bovino, caprino e bubalino, com enzima livre e imobilizada, propondo um novo processo integrado de hidrólise e ultrafiltração. Conseguiu-se imobilizar a enzima β -galactosidase de origem do micro-organismo *Kluyveromyces lactis* em esferas de alginato com eficiência de imobilização de 79,8% e rendimento de 85,2%. Verificou-se maior atividade enzimática em pH 7,0 e a 35 °C, para ambas as formas da enzima. Foi observada maior estabilidade ao pH e temperatura para a enzima imobilizada, enquanto que, para a enzima livre obteve-se maior conversão da lactose durante o processo de hidrólise. Estes resultados podem ser explicados pela proteção conferida à enzima pelas esferas de alginato, o que também tende a reduzir a transferência de massa. A constante de Michaelis-Menten (K_m) sugeriu redução da afinidade enzima-substrato devido à imobilização, apresentando valor de $2,86 \pm 0,35$ mM para a enzima livre e $4,37 \pm 0,63$ mM para a forma imobilizada. No entanto, a velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) não demonstrou diferença estatística entre as formas de enzima, com resultados de $0,79 \pm 0,21$ e $0,56 \pm 0,15$ mM min⁻¹, para as formas livre e imobilizada, respectivamente. O processo integrado hidrólise-UF resultou em concentração de proteínas e fluxo de permeado semelhante aos valores obtidos quando realizada a UF de forma independente. A hidrólise da lactose apresentou melhor desempenho para as amostras de soro bovino, possivelmente pelo efeito inibidor do cálcio presente em maior quantidade nas amostras de soro caprino e bubalino. Além disso, a enzima imobilizada manteve mais de 85% de atividade após 15 ciclos operacionais de 40 min. Com relação à estabilidade ao armazenamento, esta foi melhorada como resultado da imobilização. De maneira geral, o processo hidrólise-UF proposto se mostrou eficiente na redução de tempo operacional, bem como para realização de um tratamento mais completo do soro de leite.

Palavras-chave: β -galactosidase; Esferas de alginato; Atividade enzimática.

3 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA LACTOSE PRESENTE NO SORO DE LEITE: ENZIMA LIVRE, IMOBILIZADA E PROCESSO INTEGRADO HIDRÓLISE-UF

3.1 INTRODUÇÃO

As proteínas concentradas do soro possuem grande interesse industrial em função de propriedades bioativas e tecnológicas (BRANDELLI et al., 2015; NISHANTHI et al., 2017). Em contrapartida, a lactose, que é o nutriente mais abundante do soro de leite, apresenta utilização em produtos lácteos bastante limitada. Deve-se esta limitação de uso, ao considerar a grande parcela da população mundial que apresenta intolerância a este dissacarídeo (KUMAR et al., 2015). Em função disso, o processo de ultrafiltração (UF), empregado para concentração das proteínas, soluciona o problema de tratamento e aproveitamento do soro de leite apenas parcialmente, pois a lactose obtida no permeado da UF é dificilmente aproveitada.

Assim, a hidrólise da lactose é uma alternativa capaz de ampliar suas possibilidades de aplicação, além de contribuir com a redução dos impactos ambientais causados pelo soro de leite (VASILEVA et al., 2016). Na forma hidrolisada, a lactose também oferece algumas vantagens tecnológicas e sensoriais, bem como proporciona melhor biodegradabilidade ao soro e torna viável sua utilização como substrato para produção de etanol e hidrogênio, por exemplo (PATEL et al., 2016; TOMASZEWSKA; BIAŁOŃCZYK, 2016; VERMA et al., 2012).

O processo de hidrólise da lactose pode ser conduzido com a enzima na forma livre ou imobilizada, mas no modo livre a enzima possui menor estabilidade para uso prolongado. A possibilidade de reutilização da enzima oferecida pelo sistema de imobilização torna esta técnica muito vantajosa, permitindo a redução do custo operacional, além de conferir maior estabilidade à enzima (SZYMAŃSKA et al., 2007; VERMA et al., 2012).

Diante do exposto, a utilização de um processo integrado, que permita a concentração das proteínas, bem como a hidrólise da lactose, possui potencial para o aproveitamento do soro de leite de forma integral. Portanto, avaliou-se o processo de hidrólise da lactose de amostras de soro de leite de diferentes espécies animais,

com enzima livre e imobilizada, propondo um novo processo que integra a hidrólise com a ultrafiltração de maneira simultânea.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Materiais utilizados

A enzima empregada na hidrólise da lactose das amostras de soro foi uma β -galactosidase (β -gal), de origem da fermentação controlada do micro-organismo *Kluyveromyces lactis*, a qual foi doada pela empresa Granotec (Araucária, PR, Brasil). De acordo com a descrição do fabricante, a enzima apresenta forma líquida, coloração amarelo claro, atividade enzimática de 6500 U mL⁻¹ e condições de atuação entre 2-42 °C e pH 5,0-7,5.

Os reagentes ortho-nitrophenyl (ONP) e ortho-nitrophenyl- β -D-galactoside (ONPG) foram adquiridos comercialmente (Sigma Aldrich) e utilizados para a determinação da atividade da β -galactosidase.

O kit enzimático utilizado para a determinação de glicose foi o Glicose Liquiform, com padrão incluído, da empresa Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil).

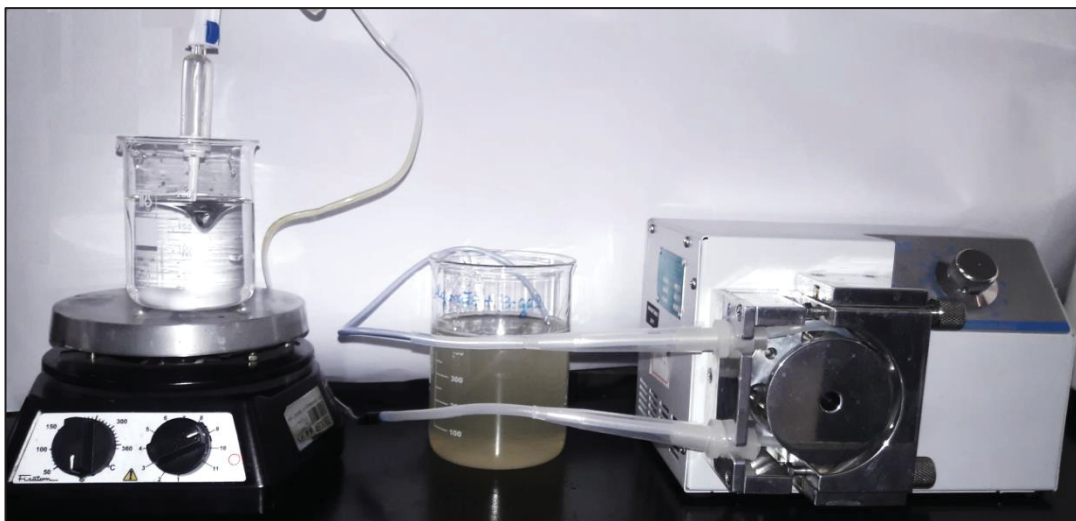
Os demais reagentes utilizados durante as análises eram todos de pureza analítica e foram adquiridos comercialmente.

3.2.2 Imobilização da enzima

A imobilização da enzima β -galactosidase foi realizada em esferas de alginato de sódio, conforme metodologia descrita por Prashanth e Mulimani (2005) com modificações. Uma solução de alginato de sódio a 4% foi preparada em água destilada e agitada até se observar uma solução límpida e homogênea. A solução de alginato foi então suavemente misturada em uma proporção de 4:1 (v:v) com a solução de enzima. A mistura enzima-alginato resultante foi adicionada gota a gota com o auxílio de uma bomba peristáltica (BP 600, Milan Equipamentos Científicos,

Brasil) sobre uma solução de CaCl_2 0,2 M em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), sob agitação constante, como ilustra a Figura 18.

FIGURA 18 - SISTEMA UTILIZADO PARA IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA NAS ESFERAS DE ALGINATO.



Fonte: A autora (2020).

As gotas formaram instantaneamente esferas de gel em contato com a solução de CaCl_2 , que foi mantida sob agitação magnética constante. As esferas contendo as enzimas imobilizadas foram mantidas na solução de CaCl_2 durante 20 minutos e então lavadas com tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) para remoção das moléculas de enzima não retidas.

Após, as esferas obtidas foram armazenadas em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH = 4,5) a 4 °C, em frasco vedado até sua aplicação na hidrólise das amostras de soro.

A eficiência da imobilização (EI) e o rendimento da imobilização (RI) foram calculados de acordo com a Equação 19 e Equação 20, respectivamente (VERMA et al., 2012):

$$EI (\%) = \frac{\alpha_i}{\alpha_l} \times 100 \quad (19)$$

Seno: α_i é a atividade da enzima imobilizada e α_l é a atividade da enzima livre.

$$RI (\%) = \frac{P_i - (P_w + P_s)}{P_i} \times 100 \quad (20)$$

Sendo: P_i é o teor proteico total da preparação enzimática bruta, P_w e P_s são a concentração de proteína da solução de lavagem e sobrenadante após a imobilização, respectivamente.

3.2.3 Processo de hidrólise

Inicialmente foram conduzidos experimentos para determinação das melhores condições de processo, bem como para investigar de modo comparativo o desempenho da hidrólise da lactose com a enzima na forma livre e imobilizada. Estes ensaios foram conduzidos em Erlenmeyers acoplados a banho tipo Dubnoff (SL-157, Solab) com agitação de 150 rpm, utilizando sempre como substrato a solução de ONPG 13 mM e enzima na concentração de 2 U mL^{-1} .

a) Efeito do pH na atividade enzimática

Para determinar o pH ótimo para a atividade da β -galactosidase, livre e imobilizada, durante as reações enzimáticas, foi utilizado tampão fosfato de sódio 0,1 M, variando o pH entre 5,0 e 7,5. As condições de tempo e temperatura dos ensaios enzimáticos foram 10 min e 37°C , respectivamente. A reação foi interrompida com a adição de 0,5 mL de carbonato de sódio 10 % (m/v).

As atividades relativas aos diferentes valores de pH foram quantificadas e expressas em relação à atividade obtida no ensaio padrão (37°C , pH 6,5 e tempo de 10 min).

b) Efeito da temperatura na atividade enzimática

Verificou-se o efeito da temperatura na atividade da β -galactosidase livre e imobilizada em diferentes temperaturas de processo: 25, 30, 35, 40 e 45 °C. O substrato ONPG foi pré-incubado, a pH 7,0, nas respectivas temperaturas durante 5 minutos e então a enzima foi adicionada. Após 10 min de processo a reação foi interrompida com a adição de 0,5 mL de carbonato de sódio 10 % (m/v).

A atividade relativa (%) foi expressa como a razão entre a atividade de β -galactosidase obtida na respectiva temperatura e a atividade enzimática obtida na condição de ensaio padrão (37 °C, pH 6,5 e tempo de 10 min).

A estabilidade térmica da enzima β -galactosidase também foi estudada. Para isso, foram conduzidos ensaios com ambas as enzimas, livre e imobilizada, segundo metodologia de Verma et al. (2012) com modificações. A avaliação da termoestabilidade das enzimas foi realizada na ausência de substrato, a 40 °C para a forma livre e a 40 e 60 °C para a enzima imobilizada. A atividade enzimática foi monitorada por um período de 6 h.

3.2.4 Ensaio cinético com soro de leite

A cinética de reação enzimática da lactose foi analisada para a enzima livre e imobilizada ao longo de 120 minutos de reação, a 35 °C. A amostra de soro bovino reconstituído 6% (m/v) foi utilizada neste ensaio, contendo concentração de lactose inicial de 41,2 g L⁻¹ e valor de pH ajustado para 7,0, com solução de NaOH (1N). A conversão da lactose foi monitorada pela análise da concentração de glicose pelo kit enzimático glicose-oxidase, como descrito no subitem 4.2.7.

3.2.5 Determinação das constantes cinéticas

A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima de reação enzimática ($V_{m\acute{a}x}$) foram obtidas em ensaio com ONPG em diferentes concentrações (1-13 mM), a pH 7,0 e 37 °C, para a β -gal livre e imobilizada. O método de Lineweaver-Burk foi utilizado, plotando-se os valores de $1/V$ versus $1/[S]$. Assim, os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram calculados de acordo com a Equação 21:

$$\frac{1}{V} = \left(\frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}} \times \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (21)$$

Sendo: K_m e $V_{m\acute{a}x}$ expressos em mM e $\mu\text{mol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$, respectivamente.

3.2.6 Ensaios de estabilidade

a) Reutilização da β -galactosidase imobilizada

O potencial de reutilização da enzima imobilizada foi avaliado pela realização da hidrólise da lactose presente na amostra de soro bovino reconstituído, em condições de ensaio 35 °C, pH 7,0 e tempo reação de 50 min, repetidas vezes. Depois de cada ciclo, as esferas contendo as enzimas imobilizadas foram removidas e lavadas com água deionizada e tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0). A atividade da enzima imobilizada foi calculada após cada ciclo de hidrólise e comparada com a atividade enzimática inicial.

b) Estabilidade ao armazenamento da enzima imobilizada

A estabilidade ao armazenamento da enzima β -galactosidase foi determinada pelo monitoramento da atividade da enzima imobilizada durante o seu

armazenamento em tampão acetato de sódio 0,1 M (pH = 4,5), a 4 °C por período de 90 dias. A atividade foi comparada com a atividade enzimática inicial e com a estabilidade ao armazenamento da enzima na forma livre.

3.2.7 Ensaios de hidrólise-UF com o soro de leite

Nesta etapa da pesquisa, que emprega os processos de hidrólise e ultrafiltração de forma integrada, o mesmo módulo dos experimentos de UF foi utilizado (Capítulo II - Figura 8). Contudo, no tanque de alimentação, além da adição da amostra de soro, foi inserido um suporte (sachê) contendo as esferas com as enzimas imobilizadas. Desta forma, as esferas estavam submersas na amostra que se pretendia hidrolisar e ultrafiltrar. Ensaios com a enzima livre também foram conduzidos com a adição da solução de enzima ao tanque de alimentação.

Os ensaios do processo integrado de hidrólise-UF foram conduzidos nas condições operacionais de 35 °C, 50 kPa e pH 7,0. Estes valores foram escolhidos por serem próximos àqueles que proporcionaram maiores valores para a concentração de proteínas e fluxo de permeado pela UF, e maior atividade enzimática no processo de hidrólise com ONPG.

A concentração de lactose inicial era 41,2; 42,5; 39,2 e 46,3 g L⁻¹, para as amostras de soro bovino reconstituído e soros frescos de origem bovina, caprina e bubalina, respectivamente. Para efeito de comparação, a concentração de lactose das amostras foi padronizada em 38 g L⁻¹, por meio de diluição em água deionizada. O volume de amostra, já diluída, utilizado em cada ensaio foi de 3 L. O valor de pH das amostras foi ajustado com solução de NaOH (1N).

O processo hidrólise-UF foi realizado durante tempo total de 50 min, sendo os primeiros 40 min em reciclo total, onde tanto o concentrado quanto o permeado retornavam para o tanque de alimentação. Nos 10 min restantes, o permeado foi coletado separadamente, enquanto o concentrado retornou ao tanque de alimentação.

3.2.8 Análises de caracterização

Os hidrolisados de soro de leite, bem como as enzimas imobilizadas, foram caracterizados por meio de análises físico-químicas descritas a seguir. Os laboratórios envolvidos nestas análises foram o Laboratório de Emulsões (Emultec) e o Laboratório de Análise de Alimentos do Programa de Pós-graduação em Alimentação e Nutrição, ambos da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

a) Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose presente nas amostras após hidrólise da lactose foi determinada por método espectrofotométrico utilizando kit enzimático glicose-oxidase. O kit enzimático é composto por reativo enzimático (glicose-oxidase e peroxidase); reativo de cor 1 (4-aminofenazona e tampão tris) e reativo de cor 2 (fenol).

A glicose-oxidase presente no kit catalisa a oxidação da glicose em ácido glucônico, com formação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2). O ácido glucônico, por sua vez, reage com o fenol e com o 4-aminofenazona, na presença da peroxidase, com formação de um composto vermelho-violeta (TOMÁS, 1988).

Como a intensidade de coloração é proporcional à concentração de glicose, esta foi determinada com leitura em espectrofotômetro UV-Vis, marca Shimadzu, modelo UV-1800, em comprimento de onda de 505 nm. Para isso, foi construída, previamente, uma curva padrão de glicose.

b) Análise de lactose

A concentração de lactose das amostras antes e após cada processo de hidrólise foi determinada pelo método DNS, usando a metodologia descrita por Miller (1959), conforme descrito no Capítulo II.

c) Teor de proteínas

O teor de proteína da solução enzimática de alginato, antes e após a imobilização e também da solução tampão de lavagem, foi determinado pelo método espectrofotométrico de Lowry et al. (1951). A albumina de soro bovino foi utilizada como proteína padrão para construção da curva de calibração.

Estas informações foram utilizadas para o cálculo do rendimento da imobilização, como descrito previamente.

d) Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática da β -galactosidase foi determinada por método espectrofotométrico, no comprimento de onda de 420 nm, utilizando como substrato sintético o ortho-nitrophenyl- β -D-galactoside (ONPG) para reação com a enzima. Este método foi aplicado conforme a descrição de Verma et al. (2012), onde a solução contendo a enzima (2 U) foi adicionada ao substrato ONPG (13 mM) preparado em tampão fosfato 0,1 M. As condições padrões de temperatura (37 °C), pH (6,5) e tempo (10 min) foram empregadas nesta etapa. Para interromper a reação de hidrólise foi adicionado 0,5 mL de carbonato de sódio 1 M.

Para a determinação da atividade da β -galactosidase imobilizada foram adotados os mesmos procedimentos e condições experimentais utilizadas para a enzima livre, conforme metodologia de Verma et al. (2012). Neste caso, para interromper a reação, a enzima foi removida e a solução coletada foi analisada.

A curva de calibração foi elaborada com o reagente ortho-nitrophenyl (ONP), em diferentes concentrações. Assim, a atividade enzimática foi calculada com base na liberação de diferentes concentrações de ONP.

Uma unidade de atividade da enzima β -galactosidase (U) é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa o ONPG em 1 μ mol de o-nitrofenol por minuto (U mL^{-1}), sob as condições empregadas.

A atividade enzimática obtida, para a enzima livre e imobilizada, sob as condições padrões empregadas, utilizando ONPG como substrato, foram consideradas como atividades controle, ou seja, representam 100%.

3.2.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* Statistica (10.0, Statsoft Inc., Tulsa, EUA), as médias foram comparadas usando análise de variância (ANOVA) e suas diferenças foram analisadas usando o teste de Tukey com nível de significância de 5%.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Imobilização da β -gal

As esferas de alginato contendo a enzima β -galactosidase foram obtidas com aproximadamente 3 mm de diâmetro e massa de $0,063 \pm 0,005$ g cada, Figura 19.

FIGURA 19 - ESFERAS DE ALGINATO CONTENDO A ENZIMA β -GALACTOSIDASE IMOBILIZADA.



Fonte: A autora (2020).

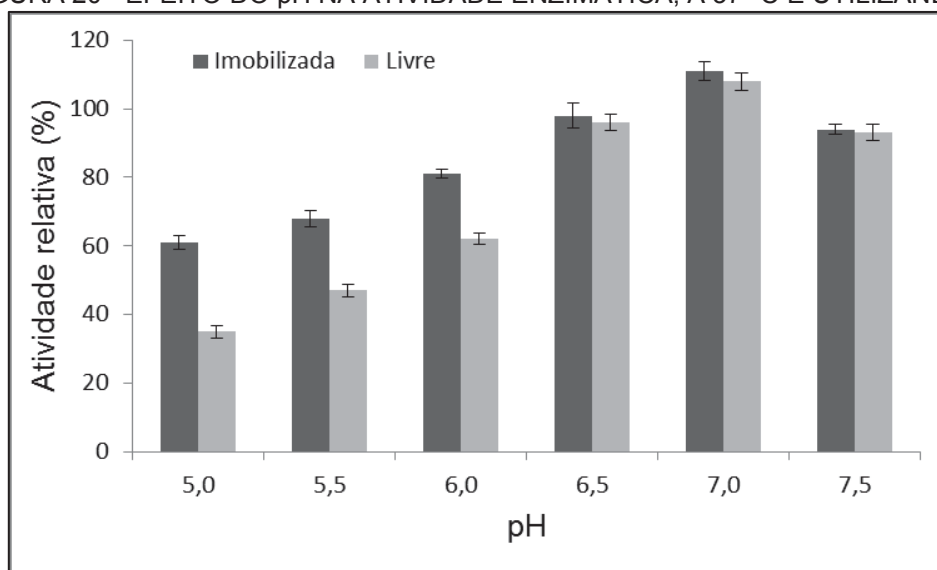
A eficiência da imobilização (EI) da enzima nas esferas de alginato, definida como a razão entre a atividade da enzima imobilizada e a atividade da enzima livre, foi de 79,8%. Este resultado evidencia que a estratégia de imobilização adotada no presente trabalho, que foi de aprisionamento da enzima, se mostrou adequada, visto que a perda da atividade enzimática foi relativamente pequena. No estudo de Verma et al. (2012), a eficiência de 66% foi observada durante a imobilização por ligação covalente da β -gal de *Kluyveromyces lactis* em nanopartículas de sílica.

O rendimento da imobilização (RI), obtido na presente pesquisa, para a enzima β -galactosidase de origem do *Kluyveromyces lactis* em esferas de alginato de sódio, foi de 85,2%. Este rendimento foi muito semelhante aos máximos valores reportados pela literatura, que foram 87% obtidos por Verma et al. (2012) durante imobilização da β -gal de *Kluyveromyces lactis* em nanopartículas de sílica e, 85% por Husain et al. (2011), na imobilização da β -gal de *Aspergillus oryzae* em nanopartículas de óxido de zinco.

3.3.2 Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática

A Figura 20 mostra o efeito do pH, analisado na faixa de 5,0 a 7,5, sobre a atividade da enzima na forma livre e imobilizada nas esferas de alginato.

FIGURA 20 - EFEITO DO pH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA, A 37 °C E UTILIZANDO ONPG.



Fonte: A autora (2020).

A β -galactosidase livre e imobilizada apresentou o mesmo pH ótimo de 7,0, sendo que não houve diferença na atividade enzimática entre as enzimas para este valor. Para pH de 6,5 e 7,5, também não foi observada diferença entre a atividade para a enzima livre e imobilizada.

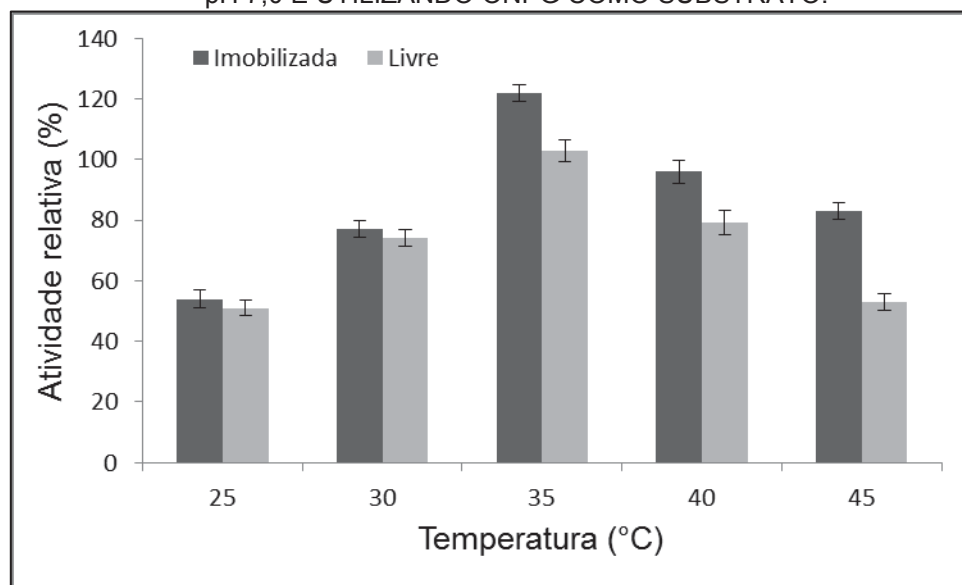
Observou-se ainda que quanto menor o pH, dentro da faixa analisada, menor foi a atividade enzimática para ambas as formas de aplicação da enzima. No entanto, mesmo nos valores de pH 5,0, 5,5 e 6,0, a enzima imobilizada demonstrou maior atividade em relação à enzima livre. Possivelmente, a imobilização conferiu uma maior estabilidade à enzima, o que proporcionou este comportamento, pois a pH 5,0 a enzima imobilizada teve sua atividade reduzida para 61%, enquanto a enzima livre obteve atividade de apenas 35%.

Na imobilização da β -galactosidase de *Escherichia coli* em membrana de polipropileno, realizada por Vasileva et al. (2012), os valores de pH que resultaram em maior atividade enzimática variaram entre 6,8 e 7,4. Os autores reportaram uma menor sensibilidade da enzima imobilizada à mudança de pH, sendo verificada em pH 5,0 atividades de 20 e 71%, para as enzimas livre e imobilizada, respectivamente. No estudo de Klein et al. (2013) foi observado resultado semelhante, onde a β -gal de *Kluyveromyces lactis* imobilizada por ligação covalente em partículas de quitosana, mesmo em pH 5,5 obteve atividade de 70%, enquanto a enzima livre apresentou atividade de 25% nesta condição.

Portanto, os resultados da investigação da influência do pH sobre a atividade da enzima livre e imobilizada sugerem que o processo de imobilização não altera o valor de pH ótimo, o qual depende da origem da enzima. Porém, a imobilização confere à enzima uma maior estabilidade frente à diminuição do pH.

O efeito da temperatura do processo de hidrólise sobre a atividade enzimática, para a enzima livre e imobilizada, está ilustrado pela Figura 21.

FIGURA 21 - EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA, A pH 7,0 E UTILIZANDO ONPG COMO SUBSTRATO.



Fonte: A autora (2020).

Verificou-se, para a faixa estudada de 25 a 45 °C, a temperatura ótima de 35 °C para ambas as enzimas. Nesta temperatura, a atividade da enzima imobilizada (122%) foi bastante superior à atividade da condição padrão, que havia sido considerada como 100%, enquanto a atividade da enzima livre foi de 103%.

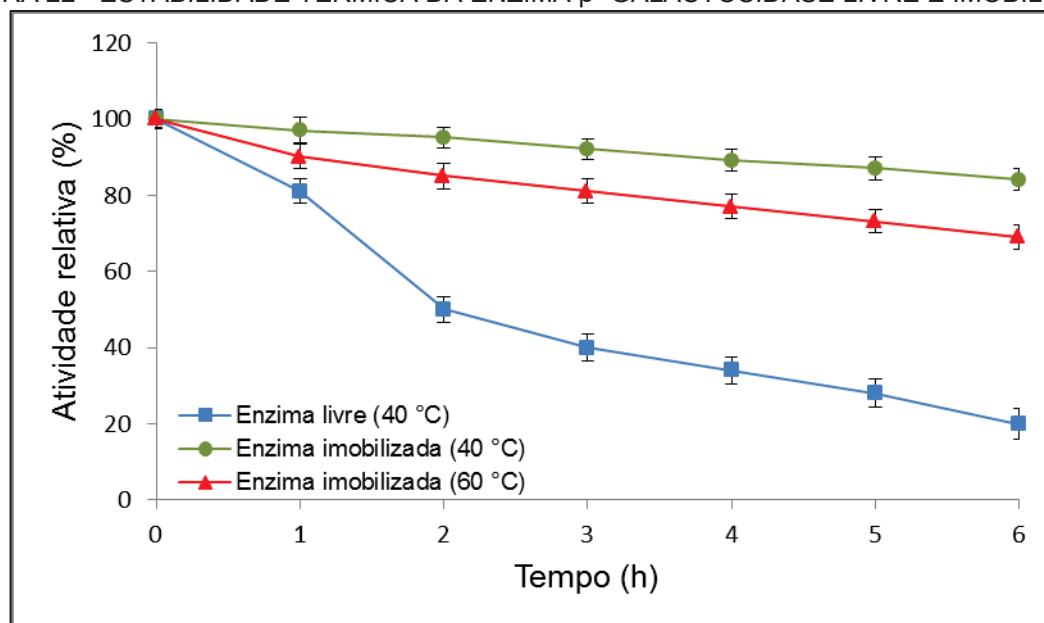
A partir da Figura 21 também é possível observar que para os menores valores de temperatura, 25 e 30 °C, as atividades não diferem estatisticamente para as enzimas livre e imobilizada no mesmo valor de temperatura. No entanto, a partir de 35 °C a atividade enzimática da enzima imobilizada foi significativamente superior em comparação à enzima livre, se mantendo consideravelmente elevada. Na temperatura de 45 °C, por exemplo, a enzima imobilizada manteve 83% de atividade, enquanto a enzima livre apenas 46%.

Ansari e Husain (2012), que imobilizaram a β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* em um suporte de Concanavalina A, verificaram atividade enzimática ótima a 50 °C. Os autores relataram estabilidade térmica melhorada da β -gal imobilizada, com valores de atividade de 72 e 35% a 70 °C para as enzimas imobilizada e livre, respectivamente. A enzima β -gal de *Kluyveromyces lactis* imobilizada em quitosana também foi mais ativa em uma faixa mais ampla de temperaturas, conforme constatado por Klein et al. (2013).

Deste modo, assim como ocorreu para o pH, a imobilização não interferiu no valor ótimo da temperatura de hidrólise, mas proporcionou melhora na estabilidade da enzima, resultado da proteção oferecida pelas esferas de alginato à enzima.

A termoestabilidade da β -galactosidase imobilizada em comparação com a enzima livre é ilustrada pela Figura 22.

FIGURA 22 - ESTABILIDADE TÉRMICA DA ENZIMA β -GALACTOSIDASE LIVRE E IMOBILIZADA.



Fonte: A autora (2020).

Os resultados ilustrados pela Figura 22 evidenciam a estabilidade conferida à enzima β -gal de *Kluyveromyces lactis* pela imobilização por aprisionamento em esferas de alginato. Na primeira hora de ensaio experimental a enzima apresentou atividade elevada, acima de 80%, para todas as condições testadas. Porém, após 2 h de reação de hidrólise, a enzima livre já apresentava apenas 50% de atividade a 40 °C, enquanto a enzima imobilizada manteve atividade em 95 e 85%, para os ensaios a 40 e 60 °C, respectivamente. Ao final das 6h de processo, a atividade da enzima imobilizada era de 84 e 69%, para os ensaios a 40 e 60 °C, respectivamente, enquanto a enzima livre retinha somente 20% de atividade.

A termoestabilidade da enzima β -gal de *Kluyveromyces lactis* também foi avaliada por Verma et al. (2012), os quais verificaram atividade de 16% da enzima livre após 8 h de incubação a 35 °C, enquanto que a enzima imobilizada em sílica demonstrou 82% de atividade após as 8 h de incubação na mesma condição.

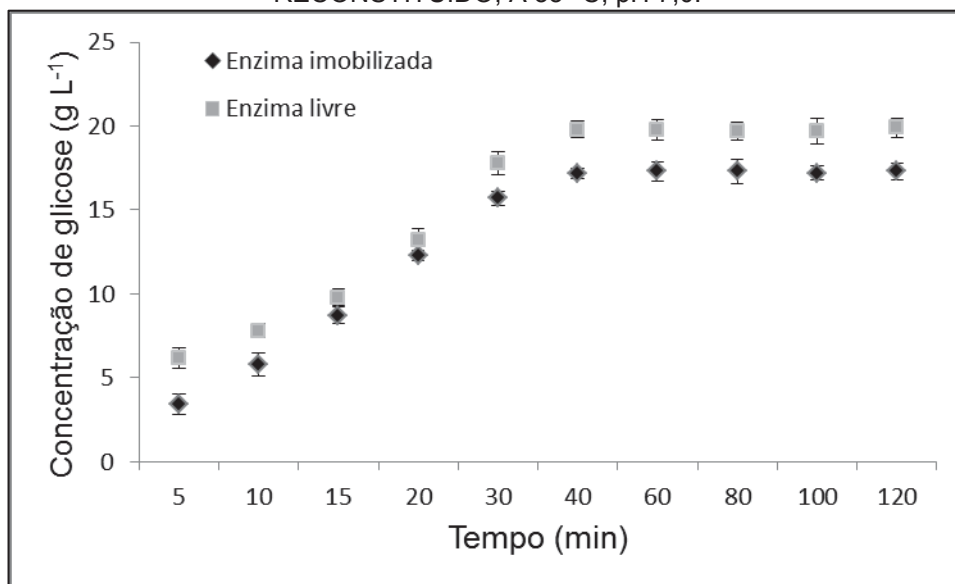
De acordo com Taqieddin e Amiji (2004), o aumento da estabilidade observada devido à imobilização pode ser atribuído à redução na mobilidade da estrutura proteica da enzima, protegendo-a dos efeitos nocivos do ambiente.

Assim, os resultados destes ensaios, além de estarem em concordância com aqueles reportados pela literatura, demonstram que a imobilização proporciona uma importante vantagem, visto que a inativação térmica pode ser um fator limitante para aplicação de enzimas em processos industriais.

3.3.3 Cinética do processo de hidrólise da lactose

Após definição das melhores condições experimentais utilizando o ONPG como substrato, a amostra de soro de leite bovino reconstituído foi empregada no ensaio cinético do processo de hidrólise com a enzima livre e imobilizada, conforme ilustrado pela Figura 23.

FIGURA 23 - CINÉTICA DA HIDRÓLISE DA LACTOSE PRESENTE NO SORO BOVINO RECONSTITUÍDO, A 35 °C, pH 7,0.



Fonte: A autora (2020).

Verificou-se, para o ensaio de hidrólise com o soro bovino reconstituído como substrato, comportamento semelhante da conversão de lactose em glicose para

ambas as formas de enzima empregadas, com estabilização da conversão em torno de 40 min de incubação.

Porém, a enzima na forma livre apresentou melhor desempenho, resultando em maior concentração de glicose a partir da lactose hidrolisada. Aos 40 min de processo, a concentração de glicose observada ao utilizar a enzima imobilizada foi de $17,2 \text{ g L}^{-1}$, enquanto que para a enzima livre o valor verificado foi de $19,8 \text{ g L}^{-1}$. Esta concentração está muito próxima à conversão teórica máxima de lactose de $20,6 \text{ g L}^{-1}$, considerando que cada molécula de lactose produz uma molécula de glicose e uma de galactose, e que a concentração inicial de lactose da amostra era de $41,2 \text{ g L}^{-1}$.

Assim, pode-se dizer que o processo de hidrólise foi eficiente, resultando em 96,1 e 83,5% de hidrólise da lactose, utilizando enzima livre e imobilizada, respectivamente. O fato da quantidade de lactose hidrolisada ter sido inferior na enzima imobilizada pode ser atribuído à redução na transferência de massa do processo, consequência do próprio método de imobilização por aprisionamento.

Das et al. (2015), por sua vez, assim como no presente trabalho, observaram menor conversão de lactose em glicose para a forma imobilizada em comparação à enzima na forma livre, o que, segundo os autores, pode ser devido a alterações ocorridas na conformação da enzima β -gal de *Bacillus circulans* após o aprisionamento da mesma em esferas de alginato.

Bosso et al. (2016), que utilizaram a enzima *Kluyveromyces lactis* na forma livre para hidrólise da lactose de leite desnatado, obtiveram valor máximo de hidrólise da lactose de 92,5%, a pH 7,0 e 40 °C.

No estudo de Haider e Husain (2009), a hidrólise de 77% da lactose presente no leite e 86% no soro de leite foi observada utilizando a enzima β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada, por reticulação, em esferas de alginato. No entanto, diferentemente do observado no presente trabalho, estes autores relataram que a β -galactosidase imobilizada foi mais eficiente na hidrólise da lactose do que a forma livre, a qual resultou em 54 e 69% de hidrólise para as amostras de leite e soro de leite, respectivamente.

Portanto, possivelmente a diferença entre os métodos de imobilização empregados, provocaram as divergências observadas. Além disso, a utilização de enzimas de diferentes origens pode resultar em distintos comportamentos durante o processo de hidrólise enzimática.

3.3.4 Constantes cinéticas

A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima de reação ($V_{m\acute{a}x}$) foram determinadas a fim de caracterizar a enzima e verificar a influência da imobilização sobre as constantes cinéticas, sendo seus resultados apresentados pela Tabela 23.

TABELA 23 - INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO SOBRE AS CONSTANTES CINÉTICAS.

Forma da enzima	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (mM min ⁻¹)
Livre	2,86 ± 0,35 ^B	0,79 ± 0,21 ^A
Imobilizada	4,37 ± 0,63 ^A	0,56 ± 0,15 ^A

Valores são médias ± desvio padrão.

Letras diferentes na mesma coluna denotam diferença estatística de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

O K_m , que expressa a relação de afinidade entre a enzima e o substrato, demonstrou aumento em torno de 50% da enzima livre em relação à forma imobilizada. Uma vez que, menor valor de K_m indica maior afinidade da enzima pelo substrato estudado, notou-se que a imobilização da enzima prejudicou sua afinidade pelo substrato. Possivelmente, a dificuldade de acesso do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada explica o efeito observado. O $V_{m\acute{a}x}$, por sua vez, não foi influenciado pelo processo de imobilização, sendo obtidos valores significativamente iguais para ambas as formas de utilização da enzima.

No estudo de Haider e Husain (2009), também foi observada mudança na afinidade da enzima pelo substrato, enquanto que não houve alteração para o valor da velocidade de reação entre enzima livre e imobilizada. Segundo os autores, é interessante que $V_{m\acute{a}x}$ seja afetado menos de K_m durante a imobilização. De acordo com Verma et al. (2012), valores mais altos de K_m após a imobilização da β -gal têm sido relatados por diversos pesquisadores, com diferenças que variam de 20% a até 5,4 vezes de aumento. Ainda de acordo com os autores, as alterações nos parâmetros cinéticos sugerem que o processo de imobilização resultou em alteração da afinidade da enzima pelo substrato devido à diminuição do acesso do substrato ao local ativo da enzima.

3.3.5 Processo integrado hidrólise-UF

Nesta etapa, as amostras de soro bovino reconstituído e soros frescos de origem bovina, caprina e bubalina foram então submetidas ao processo integrado hidrólise-UF, resultando nos valores apresentados na Tabela 24.

TABELA 24 - RESULTADOS OBSERVADOS PARA O PROCESSO HIDRÓLISE-UF COM ENZIMA LIVRE E IMOBILIZADA, A 35 °C, 50 kPa, pH 7,0, DURANTE 50 MIN.

Amostra	Forma da enzima	Proteína no concentrado (g L ⁻¹)	Fluxo de permeado (kg m ⁻² h ⁻¹)	Hidrólise da lactose (%)
Soro bovino reconstituído	Livre	37,42 ± 1,63 ^E	5,52 ± 0,71 ^{BC}	95,84 ± 2,16 ^A
	Imobilizada	36,27 ± 0,95 ^E	7,89 ± 1,23 ^A	88,32 ± 2,03 ^{BC}
Soro de leite bovino	Livre	37,98 ± 0,94 ^D	5,61 ± 0,84 ^{BC}	96,53 ± 1,89 ^A
	Imobilizada	38,06 ± 1,42 ^{CD}	7,78 ± 1,66 ^{AB}	90,26 ± 1,56 ^B
Soro de leite de cabra	Livre	41,04 ± 1,52 ^B	4,22 ± 0,29 ^D	83,63 ± 2,72 ^{CD}
	Imobilizada	40,41 ± 1,21 ^{BC}	5,86 ± 1,32 ^{ABC}	76,42 ± 2,07 ^E
Soro de leite de búfala	Livre	44,63 ± 1,78 ^A	3,18 ± 0,68 ^E	80,26 ± 1,86 ^D
	Imobilizada	44,39 ± 0,82 ^A	4,47 ± 0,57 ^{CD}	73,47 ± 1,73 ^E

Valores são médias ± desvio padrão.

Letras diferentes na mesma coluna denotam diferença estatística de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

Como pode ser visualizado, o desempenho na hidrólise da lactose com a enzima na forma livre foi estatisticamente maior, para todas as amostras analisadas, em comparação com a hidrólise utilizando a enzima imobilizada. Ainda assim, a enzima imobilizada apresentou valores elevados, entre 73,5 e 90,3%, para conversão da lactose.

A hidrólise da lactose das amostras de soro bovino foi estatisticamente igual quando utilizada a mesma forma da enzima, ou seja, a conversão de lactose utilizando enzima livre foi considerada igual para as amostras de soro bovino reconstituído e fresco. Ao empregar a enzima imobilizada, ambas as amostras de soro bovino também não apresentaram diferença estatística entre si. Este comportamento também foi verificado entre as amostras de soro de leite caprino e bubalino, para ambas as formas de enzima.

Ainda em relação aos valores apresentados pela Tabela 24, verificou-se que a hidrólise da lactose das amostras de soro caprino e bubalino foi consideravelmente inferior às demais amostras. O maior conteúdo de cálcio das amostras de soro caprino e bubalino pode ter sido o causador da menor conversão da lactose, pois

conforme Gomes (2018) e Nguyen et al. (2006), o íon cálcio possui potencial efeito inibidor na atividade da enzima β -galactosidase.

Observou-se ainda, a partir dos valores obtidos para concentração de proteínas, que não houve diferença estatística dentro da mesma amostra de soro. Este resultado demonstra que a presença da enzima no tanque de alimentação, seja ela livre ou imobilizada, não interferiu na concentração das proteínas pela UF. No entanto, a forma de enzima livre interferiu negativamente no fluxo de permeado, uma vez que esta, assim como as proteínas do soro, pode ter contribuído para o efeito resistivo do fenômeno de *fouling*.

Para o processo hidrólise-UF utilizando a enzima na forma imobilizada, tanto o teor de proteínas no concentrado quanto o fluxo de permeado estão de acordo com os valores obtidos para os ensaios de UF independentes, realizados no Capítulo II, como apresentado pela Tabela 25.

TABELA 25 - COMPARAÇÃO ENTRE O PROCESSO INTEGRADO HIDRÓLISE-UF (ENZIMA IMOBILIZADA) E O PROCESSO DE UF INDEPENDENTE.

Amostra	Proteína no concentrado (g L ⁻¹)		Fluxo de permeado (kg m ⁻² h ⁻¹)	
	Processo hidrólise-UF	Processo UF	Processo hidrólise-UF	Processo UF
Soro bovino reconstituído	36,27 ± 0,95 ^{Ca}	35,26 ± 0,93 ^{Ca}	7,89 ± 1,23 ^{Aa}	8,93 ± 1,48 ^{Aa}
Soro de leite bovino	38,06 ± 1,42 ^{BCa}	36,74 ± 1,02 ^{Ca}	7,78 ± 1,66 ^{Aa}	7,94 ± 0,98 ^{Aa}
Soro de leite de cabra	40,41 ± 1,21 ^{Ba}	39,74 ± 1,25 ^{Ba}	5,86 ± 1,32 ^{ABa}	5,92 ± 0,56 ^{Ba}
Soro de leite de búfala	44,39 ± 0,82 ^{Aa}	43,76 ± 2,70 ^{Aa}	4,47 ± 0,57 ^{Ba}	4,72 ± 0,37 ^{Ca}

Valores são médias ± desvio padrão.

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

Os resultados observados confirmam a reprodutibilidade dos ensaios de UF, além de evidenciarem que a aplicação de um processo integrado hidrólise-UF não afeta o objetivo individual de cada processo, seja ele a hidrólise da lactose ou a concentração de proteínas, desde que a enzima seja aplicada na forma imobilizada.

Notou-se também, que a lactose na forma hidrolisada (glicose+galactose) permeou mais a membrana, pois a concentração de glicose observada foi maior na corrente de permeado em relação ao concentrado, Tabela 26. Enquanto que, no processo de UF, realizado no Capítulo II, o teor de lactose havia sido maior no concentrado para todas as amostras analisadas. Este resultado é positivo, pois, assim, foram obtidos concentrados proteicos mais purificados.

TABELA 26 - CONCENTRAÇÕES DE GLICOSE NAS AMOSTRAS DE CONCENTRADO E PERMEADO OBTIDAS APÓS O PROCESSO INTEGRADO HIDRÓLISE-UF COM ENZIMA IMOBILIZADA.

Amostras		Glicose (g L ⁻¹)
Soro bovino reconstituído	Concentrado	6,36 ± 0,52
	Permeado	10,73 ± 0,45
Soro de leite bovino	Concentrado	6,94 ± 0,38
	Permeado	11,15 ± 0,44
Soro de leite de cabra	Concentrado	5,56 ± 0,56
	Permeado	9,38 ± 0,62
Soro de leite de búfala	Concentrado	4,27 ± 0,36
	Permeado	10,92 ± 0,47

Valores são médias ± desvio padrão.

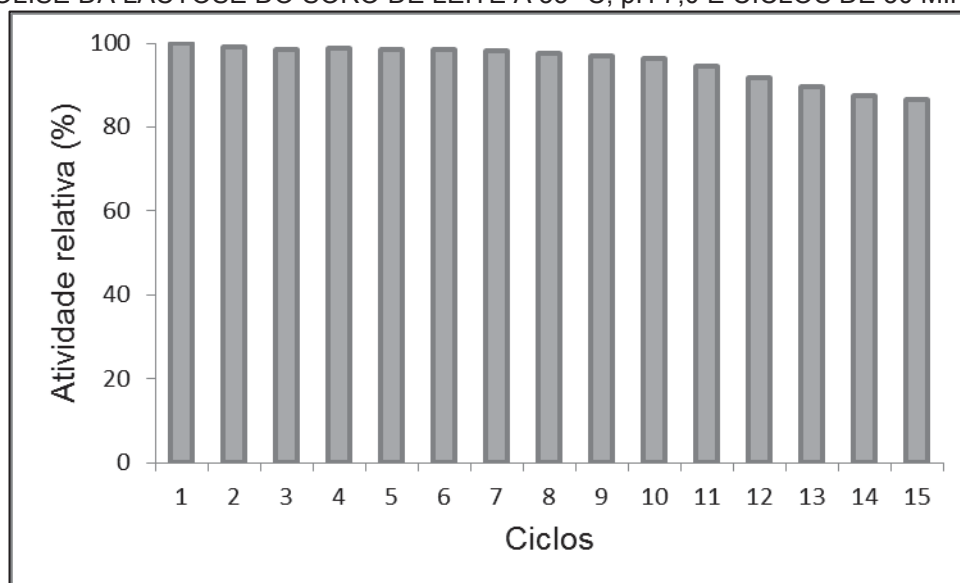
Além disso, a economia de tempo operacional ao utilizar o processo integrado é de fundamental importância, especialmente em nível industrial, o que pode se tornar uma vantagem competitiva. No processo hidrólise-UF empregado, o tempo de ensaio adotado de 50 min, foi suficiente para concentrar as proteínas e obter lactose hidrolisada. Anteriormente, os processos individuais de UF e hidrólise haviam sido realizados durante 40 min para cada.

3.3.6 Estabilidade a reutilização e ao armazenamento

A Figura 24 ilustra a estabilidade da enzima imobilizada durante sua reutilização em repetidos ciclos com a amostra de soro bovino reconstituído. A determinação deste parâmetro é de fundamental importância porque a estabilidade operacional está diretamente relacionada ao custo do processo.

O ensaio de reutilização demonstrou elevada estabilidade operacional da enzima imobilizada, com manutenção de 86,5% da atividade enzimática ao final de 15 ciclos de hidrólise. Este é um resultado importante, pois evidencia a vantagem de emprego da enzima imobilizada frente à enzima na forma livre, a qual, por sua vez, não possui possibilidade de reutilização.

FIGURA 24 - ESTABILIDADE OPERACIONAL DA ENZIMA β -GAL IMOBILIZADA DURANTE HIDRÓLISE DA LACTOSE DO SORO DE LEITE A 35 °C, pH 7,0 E CICLOS DE 50 MIN CADA.



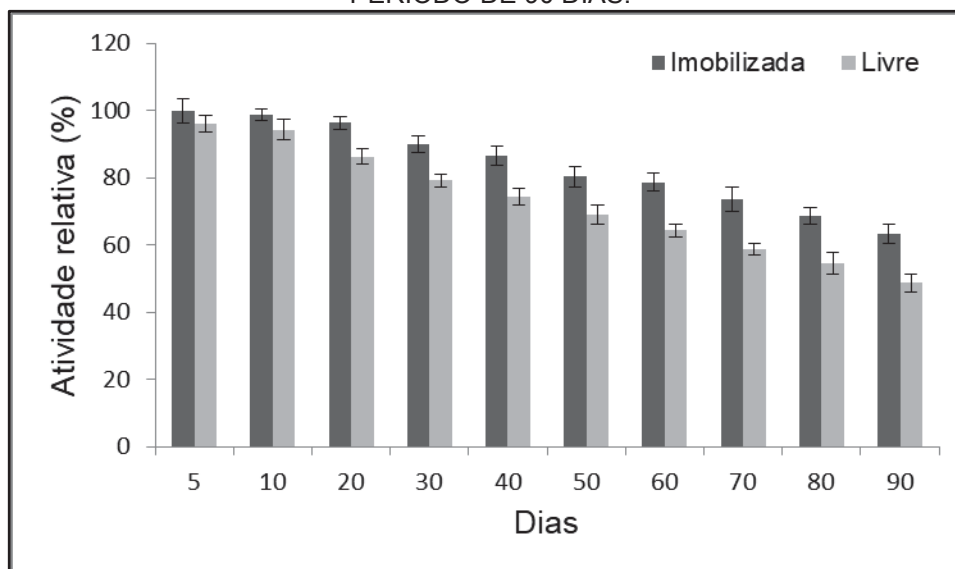
Fonte: A autora (2020).

No estudo de reutilização de Verma et al. (2012), a enzima β -gal imobilizada em nanopartículas de sílica demonstrou ser estável até 11 ciclos, restando aproximadamente 51% de sua atividade inicial. Para Fernandez-Arrojo et al. (2013), a possibilidade de reutilização da enzima imobilizada em esferas de alginato foi confirmada após realização satisfatória de 13 ciclos, de 20 min cada. Para os autores, a manutenção da atividade acima de 95% depois de vários ciclos se deve ao fato do mínimo vazamento da enzima.

No presente estudo, a estabilidade da enzima livre e imobilizada também foi avaliada com relação ao seu tempo de armazenamento em solução tampão (pH = 4,5), sob refrigeração, durante 90 dias, sendo o resultado mostrado pela Figura 25.

Observou-se, para ambas as formas de enzima aplicadas, redução da atividade enzimática ao longo do armazenamento. Porém, a enzima imobilizada apresentou melhor estabilidade ao armazenamento, com manutenção de $63,4 \pm 2,8\%$ da atividade ao fim do período avaliado, enquanto que a forma livre manteve $48,7 \pm 2,7\%$. Estes dados confirmam que a matriz de alginato forma interações com a enzima de maneira a torná-la mais estável. Além disso, os resultados obtidos são similares aos reportados na literatura.

FIGURA 25 - ESTABILIDADE DA ENZIMA β -GAL AO ARMAZENAMENTO A 4 °C, pH 4,5, POR PERÍODO DE 90 DIAS.



Fonte: A autora (2020).

No estudo de Vasileva et al. (2016), por exemplo, o armazenamento da enzima β -gal imobilizada em membrana e na forma livre, nas condições de 4 °C, pH 6,8 por 30 dias, resultou em atividade enzimática remanescente de 75 e 38%, respectivamente. Nawaz et al. (2015) também avaliaram a estabilidade ao armazenamento da enzima livre e imobilizada em esferas de alginato, neste caso uma maltase de origem do *Bacillus licheniformis*, a 4 °C durante 60 dias. Os autores relataram queda na atividade enzimática ao longo do armazenamento, com melhor desempenho da enzima imobilizada mantendo 58% da atividade, frente aos 52% da maltase livre.

Conforme Şahin et al. (2005) e Yahşi et al. (2005), imobilizações enzimáticas em hidrogéis, como alginato, gelatina e poliacrilamida, conferem alta estabilidade devido ao microambiente de proteção fornecido pela matriz de gel, minimizando possíveis efeitos do meio aquoso sobre o sítio ativo da enzima imobilizada. Por conta disto, a redução da atividade enzimática ao longo armazenamento é mais lenta em comparação à enzima livre em solução.

A estabilidade operacional e ao armazenamento, parâmetros muito importantes a serem considerados na imobilização enzimática, comprovaram, respectivamente, o potencial de reutilização da enzima e a capacidade da imobilização de fornecer maior prazo de validade à enzima em comparação com a sua forma livre.

3.4 CONCLUSÃO

A imobilização da enzima β -galactosidase (β -gal), de origem do micro-organismo *Kluyveromyces lactis*, foi realizada pelo método de aprisionamento em esferas de alginato. O processo de imobilização proporcionou eficiência de 79,8% e rendimento de 85,2%, valores que demonstram que o método de imobilização utilizado não afetou consideravelmente a atividade enzimática.

Os maiores valores de atividade enzimática foram alcançados a pH 7,0 e temperatura de 35 °C, utilizando ONPG como substrato. Sendo observada melhora na estabilidade da enzima ao ser imobilizada nas esferas de alginato.

No estudo cinético, com a amostra de soro bovino reconstituído como substrato, observou-se porcentagem de hidrólise superior para a enzima livre (96,1%) em relação à enzima imobilizada (83,5%). Sendo a conversão de lactose estabilizada aos 40 min para ambas as formas da enzima. Com relação as constantes cinéticas, K_m foi afetada pela imobilização, sofrendo aumento em torno de 50%, o que indica que a afinidade enzima-substrato foi reduzida pelo aprisionamento da enzima. No entanto, $V_{m\acute{a}x}$ da enzima imobilizada não diferiu estatisticamente do valor observado para a enzima livre, o que é vantajoso para o processo.

A enzima imobilizada apresentou elevada estabilidade operacional, o que possibilita sua reutilização por mais de 10 ciclos sem prejuízos consideráveis da atividade enzimática. Além disso, o processo de imobilização proporcionou aumento na vida útil da enzima, com manutenção de 63,4% de sua atividade após 90 dias de armazenamento.

O processo integrado hidrólise-UF mostrou-se como uma excelente alternativa para realização da concentração das proteínas e hidrólise da lactose do soro de leite de forma simultânea. Foi possível reduzir o tempo de operação ao empregar o processo integrado, sem comprometer o teor de proteínas no concentrado, o fluxo de permeado, nem mesmo a conversão da lactose em glicose+galactose.

CAPÍTULO IV
APLICAÇÃO DOS CONCENTRADOS DE PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE NO
PREPARO DE EMULSÕES

RESUMO

As proteínas do soro de leite possuem propriedades funcionais interessantes para a indústria de alimentos, com destaque para o poder emulsificante. Porém, a aplicação das proteínas do soro exige conhecimento dos fatores que podem afetar o seu desempenho na estabilidade de emulsões. Assim, neste capítulo da pesquisa, os concentrados proteicos de origem bovina, caprina e bubalina foram avaliados quanto ao seu potencial de formar emulsões. Para isso, foram investigadas as influências do pH, tratamento térmico e interação das proteínas do soro com surfatante sintético na estabilidade das emulsões. O preparo das emulsões ocorreu a partir da homogeneização de soluções aquosas contendo as proteínas do soro, em diferentes concentrações, com óleo de soja, na proporção óleo/água de 25:75 (v/v), a 12.000 rpm por 3 min. Observou-se que de maneira geral, todos os concentrados proteicos apresentaram potencial como surfatante para estabilizar emulsões O/A, a pH 7,0. No entanto, os concentrados de origem caprina e bubalina apresentaram destaque positivo na estabilidade das emulsões em comparação aos concentrados bovinos. Estes resultados foram explicados pela análise da tensão superficial, onde verificou-se concentração micelar crítica de 1,7% para as proteínas do soro de cabra e búfala e, de 2,1% para concentrados proteicos bovinos. Constatou-se que a desnaturação das proteínas do soro, por aquecimento a 80 °C durante 20 min, antes da homogeneização, influencia de forma positiva a estabilidade das emulsões. As emulsões com proteínas desnaturadas pelo calor apresentaram maior viscosidade e menor tensão superficial e tamanho de gotas. No entanto, o aquecimento pós-homogeneização (90 °C) resultou na redução do índice de estabilidade da emulsão, especialmente para aquelas emulsões obtidas em menor concentração de proteínas (abaixo de 1,5%). Além disso, foi observado efeito sinérgico na estabilidade das emulsões ao utilizar os concentrados em conjunto com o surfatante Tween 80. As emulsões preparadas com concentrado proteico e Tween 80 na proporção 1%/1% apresentaram elevada estabilidade e viscosidade, o que demonstra a possibilidade de utilização de menor concentração de compostos sintéticos quando combinado com um surfatante natural, como as proteínas do soro.

Palavras-chave: Estabilidade da emulsão; Atividade emulsificante; Proteínas; Soro de leite; Surfatante; Tween 80.

4 APLICAÇÃO DOS CONCENTRADOS DE PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE NO PREPARO DE EMULSÕES

4.1 INTRODUÇÃO

Macro e micronutrientes como lactose, proteínas, vitaminas e minerais fazem parte da rica composição do soro de leite e têm sido alvo de trabalhos visando sua recuperação através de membranas. Mas, o principal destaque são as proteínas do soro, que têm uma qualidade nutricional amplamente conhecida, devido ao seu valor biológico superior ao do ovo, carne e proteína de soja (SMITHERS, 2015). Os peptídeos das proteínas do soro são considerados substâncias bioativas, podendo promover diversos efeitos positivos tanto fisiológicos como nutricionais, com propriedades antioxidante, anti-inflamatória, hipotensora, antiobesidade, antidiabética e de biossíntese muscular (BRANDELLI et al., 2015; PATEL, 2015).

Além disso, as proteínas do soro também possuem propriedades funcionais de interesse para a indústria, tais como solubilidade, poder emulsificante, gelificação e formação de espuma (NISHANTHI et al., 2017).

Devido à qualidade nutricional e propriedades funcionais destacadas, tem havido um crescente interesse no uso de proteínas do soro em vários alimentos, como bebidas emulsionadas, molhos, sorvetes, sobremesas, carnes e produtos de panificação (ÇAKIR-FULLER, 2015). Apesar do grande potencial emulsificante das proteínas, é importante estudar seu comportamento quando submetido a tratamentos frequentemente utilizados em alimentos, como o aquecimento (LIANG et al., 2017).

Recentemente, algumas pesquisas têm relatado que mudanças na estrutura das proteínas, induzidas pelo calor, influenciam a estabilidade das emulsões (JIANG et al., 2018; MOHAMMADIAN et al., 2018; SUN et al., 2018). Dependendo do tipo de desdobramento que ocorre na estrutura da proteína durante o aquecimento, uma melhoria na estabilidade da emulsão também pode ser observada. No entanto, em alguns casos, o aquecimento das proteínas do soro pode resultar em separação de fases na emulsão, turbidez e precipitação excessivas devido à forte agregação de proteínas.

Além disso, é fundamental avaliar a estabilidade da emulsão em diferentes condições de pH e conhecer seu comportamento de interação com outros componentes, como polissacarídeos e outros surfatantes, por exemplo. Diversos estudos utilizaram proteínas de soro de leite para investigar várias propriedades da emulsão (BOUYER et al., 2012; CHEVALLIER et al., 2018; KLEIN et al., 2010; NISHANTHI et al., 2018; OWENS et al., 2018; SRIPRABLOM et al., 2019).

Até o momento, as informações da literatura sobre o soro fresco e as propriedades funcionais de suas proteínas são escassas, pois a maioria dos autores utilizam soro em pó ou WPI como matéria-prima. Estes produtos requerem processos de secagem, tais como *spray dryer*, e podem apresentar propriedades diferentes devido aos processos a que foram submetidos. Além disso, não foram encontrados estudos relatando uma comparação entre diferentes origens de proteínas do soro do leite em relação à sua capacidade de formar emulsão. Poucos dados são conhecidos sobre a interação das proteínas do soro com o surfatante Tween 80, frequentemente utilizado na indústria de alimentos devido à baixa toxicidade, especialmente no que diz respeito à estabilidade ao calor. Estas questões ainda permanecem discutíveis e precisam ser exploradas.

Assim, neste capítulo está descrito o estudo sobre a influência do tratamento térmico na pré e pós-homogeneização, o efeito do pH, bem como a consequência da interação entre as proteínas e o surfatante Tween 80, na estabilidade de emulsões preparadas usando os concentrados proteicos de soro de leite bovino, caprino e bubalino.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Materiais utilizados

Para formulação das emulsões foram utilizados óleo de soja comercial e soluções de água destilada com NaCl 1% (m/v) adicionadas dos WPCs obtidos no Capítulo II.

O surfatante comercial utilizado foi o Tween 80 (Sigma-Aldrich).

Para as análises de caracterização das emulsões foi utilizada solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Synth).

4.2.2 Preparo das emulsões

As emulsões foram preparadas com composição óleo/água de 25:75 (v/v), usando óleo de soja e solução aquosa de proteína do soro de origem bovina, caprina e bubalina. Todas as emulsões foram preparadas por agitação em homogeneizador Polytron (PT 3100 D, Kinematica AG, Suíça) a 12.000 rpm durante 3 min, a temperatura ambiente (22 °C).

A influência da variação de alguns parâmetros e tratamentos nas propriedades das emulsões foi avaliada conforme descrito a seguir.

- a) *Concentração de proteínas*: A influência da concentração de proteínas foi avaliada, para cada amostra de WPC, preparando soluções com seis diferentes concentrações entre 0,5 e 3,0% de proteínas em relação à fase aquosa.
- b) *pH*: Para avaliar o efeito do pH, as soluções de proteínas foram ajustas a pH 3, 5 ou 7, utilizando soluções de HCl (1N) ou NaOH (1N), antes da homogeneização com o óleo.
- c) *Tratamento térmico*: O impacto do tratamento térmico foi verificado antes e após a homogeneização. Para isto, as soluções de proteínas foram aquecidas a 80 °C durante 20 min, anteriormente à homogeneização, e a 90 °C por 1, 5, 10, 20 e 30 min após a homogeneização das emulsões. Estes ensaios foram realizados na condição de pH que resultou nas emulsões mais estáveis.
- d) *Adição de surfatante*: A influência da adição do surfatante comercial, Tween 80, nas propriedades das emulsões com proteínas também foi investigado. As emulsões foram preparadas com os surfatantes proteínas do soro e Tween 80 em diferentes proporções, sendo o primeiro valor em relação

à fase aquosa e o segundo referente à fase oleosa: 2,0-0,0; 1,5-0,5; 1,0-1,0; 0,5-1,5 e 0-2,0% (m/v).

4.2.3 Caracterização das emulsões

As emulsões preparadas a partir dos concentrados de soro de leite foram caracterizadas por meio de análises físico-químicas realizadas no Laboratório de Emulsões (Emultec), situado na Universidade Federal do Paraná (UFPR). Todas as análises foram realizadas em triplicata e estão descritas a seguir.

a) Tipo de emulsão

A análise de condutividade foi realizada em condutivímetro de bancada (Schott Instruments, Lab 970) para determinar se a emulsão formada foi do tipo A/O ou O/A. Quando a emulsão apresenta condutividade baixa ($\mu\text{S cm}^{-1}$), a emulsão é dita A/O. Em contrapartida, quando a condutividade é próxima ou superior a 1 mS cm^{-1} , a emulsão é classificada como O/A.

b) Atividade emulsificante

Após a preparação das emulsões, o índice de atividade emulsificante (IAE) foi determinado usando o método descrito por Pearce e Kinsella (1978) com modificações. Alíquotas de 50 μL de cada emulsão foram misturadas com 5 mL de solução 0,1% SDS. A absorbância da solução diluída foi medida a 500 nm utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, modelo UV-1800). As análises foram realizadas em triplicata logo após o preparo das emulsões e os valores de IAE foram calculados de acordo com a Equação 16:

$$\text{IAE } (m^2 g^{-1}) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0}{F \times M} \quad (16)$$

Sendo: F a fração volumétrica de óleo (0,25), M a massa de proteína da amostra, e A_0 a absorvância inicial.

c) Estabilidade da emulsão

O índice de estabilidade da emulsão (IEE), assim como IAE também foi obtido pelo método de Pearce e Kinsella (1978). As análises foram realizadas em triplicata após 4 h do preparo das emulsões. Os valores para o IEE foram obtidos utilizando a Equação 17:

$$\text{IEE } (\%) = \frac{A_t \times \Delta t}{\Delta A} \quad (17)$$

Sendo: A_0 a absorvância inicial, A_t a absorvância lida 4 h após a homogeneização, Δt o intervalo de tempo entre as leituras e ΔA a diferença entre as absorvâncias ($A_0 - A_t$).

A estabilidade também foi verificada por análise visual da separação de fases, determinando-se assim a estabilidade à cremeação ou formação do creme. De acordo com Sriprabhom et al. (2019), o índice de formação de creme (IC), ou *creaming index*, fornece uma informação indireta sobre a extensão da agregação de gotículas numa emulsão, ou seja, quanto mais agregação há, maiores os flocos e mais rápido o creme é formado. Para esta análise foi utilizada metodologia de Owens et al. (2018) com algumas modificações, que consistiu em manter as emulsões sob temperatura controlada de 25 °C, em recipientes fechados, por período de 24 h. As emulsões foram observadas quanto à separação das camadas de creme e soro e, assim, o índice de formação de creme foi determinada pela Equação 18:

$$IC (\%) = \frac{H_s}{H_0} \times 100 \quad (18)$$

Sendo: H_0 a altura total da emulsão e H_s a altura da camada de soro.

d) Tensão superficial

As medidas de tensão superficial foram realizados utilizando um tensiômetro Kruss k100 (Kruss Force Tensiometer, USA), a fim de determinar a concentração micelar crítica (CMC) de proteínas e surfatante comercial na emulsão. Aplicou-se o método do anel Du Nouy (*spindle* RI 01) a 20°C, variando as concentrações de proteínas e Tween 80 gradualmente, com obtenção de cinco dados para cada ponto de análise.

e) Análise de viscosidade

Os dados para determinação das curvas de viscosidade foram obtidos utilizando um viscosímetro rotacional Brookfield (DV-II+Pro Viscometer, Brookfield Engineering, Inc. USA) e *software* Rheocalc V3.2. Aplicou-se a variação da taxa de cisalhamento entre 5 e 100 s⁻¹ para realização dos experimentos. Optou-se pelo *spindle* SC4-18 para esta análise devido as amostras serem pouco viscosas.

f) Análise microscópica

A análise de microscopia ótica foi realizada utilizando um microscópio invertido Zeiss Axio, Observer D1 (Zeiss Vision GmbH, Alemanha), com obtenção de micrografias com aproximação de 160x. A partir desta análise foi determinada a

distribuição do tamanho de gotas (DTG), por meio do *software* ImageJ utilizando a ferramenta de medição de tamanho de partículas.

4.2.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* Statistica (10.0, Statsoft Inc., Tulsa, EUA), as médias foram comparadas usando análise de variância (ANOVA) e suas diferenças foram analisadas usando o teste de Tukey com nível de significância de 5%.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar na expressão dos resultados na forma de gráficos e tabelas, as emulsões preparadas com os concentrados foram denominadas da seguinte maneira: ESBR – emulsão com concentrado de soro bovino reconstituído; ESBF – emulsão com concentrado de soro bovino fresco; ESCF – emulsão com concentrado de soro caprino fresco e ESBUF – emulsão com concentrado de soro bubalino fresco.

Com relação ao tipo de emulsão, avaliado pelo valor da condutividade, todas as emulsões foram consideradas como do tipo O/A, uma vez que os valores observados foram próximos a 1 mS cm^{-1} .

4.3.1 Efeito do pH e concentração proteica na estabilidade das emulsões

As emulsões, preparadas com diferentes concentrações de proteínas (0,5 a 3,0 %) e valores de pH (3,0; 5,0; 7,0), foram avaliadas quanto à atividade emulsificante, estabilidade (após 4 h) e índice de formação de creme (após 24 h), resultando nos dados apresentados pela Tabela 27.

TABELA 27 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E pH NO ÍNDICE DE ATIVIDADE EMULSIFICANTE (IAE), ÍNDICE DE ESTABILIDADE DA EMULSÃO (IEE) E ÍNDICE DE FORMAÇÃO DE CREME (IC) DAS EMULSÕES COM CONCENTRADOS PROTEICOS DO SORO.

ESBR – emulsão com concentrado de soro bovino reconstituído									
Proteína	IAE (m ² /g)			IEE (%)			IC (%)		
	pH = 3,0	pH = 5,0	pH = 7,0	pH = 3,0	pH = 5,0	pH = 7,0	pH = 3,0	pH = 5,0	pH = 7,0
0,5	30,5 ± 0,5 ^{Dc}	42,5 ± 1,3 ^{Cb}	50,5 ± 0,8 ^{Da}	37,2 ± 1,2 ^{Cc}	53,6 ± 0,9 ^{Db}	65,7 ± 1,2 ^{Da}	44,7 ± 1,3 ^{Aa}	18,4 ± 1,2 ^{Ab}	19,7 ± 1,4 ^{Ab}
1,0	31,7 ± 0,6 ^{Cc}	44,6 ± 0,7 ^{Bb}	52,6 ± 1,1 ^{Ca}	39,4 ± 0,5 ^{Bc}	55,3 ± 0,5 ^{Cb}	67,5 ± 0,5 ^{Ca}	41,6 ± 1,2 ^{Ba}	17,6 ± 0,8 ^{Ab}	17,1 ± 0,7 ^{Bb}
1,5	32,6 ± 0,7 ^{BCc}	45,7 ± 0,9 ^{Bb}	54,5 ± 0,6 ^{Ba}	40,1 ± 0,4 ^{Bc}	57,1 ± 0,7 ^{Bb}	71,3 ± 1,1 ^{Ba}	39,3 ± 1,7 ^{BCa}	15,5 ± 1,0 ^{Bb}	15,8 ± 1,2 ^{Bb}
2,0	34,4 ± 0,4 ^{Ac}	47,5 ± 0,7 ^{Ab}	56,4 ± 0,5 ^{Aa}	41,8 ± 1,1 ^{Ac}	58,9 ± 0,9 ^{Ab}	73,4 ± 0,7 ^{Aa}	36,4 ± 1,4 ^{Ca}	12,4 ± 1,2 ^{Cb}	12,7 ± 0,9 ^{Cb}
2,5	33,9 ± 0,6 ^{ABc}	48,4 ± 0,5 ^{Ab}	56,7 ± 0,7 ^{Aa}	42,3 ± 0,8 ^{Ac}	59,3 ± 1,3 ^{Ab}	73,8 ± 1,2 ^{Aa}	36,9 ± 1,1 ^{Ca}	13,2 ± 0,9 ^{Cb}	12,4 ± 1,1 ^{Cb}
3,0	34,5 ± 0,9 ^{Ac}	48,2 ± 0,5 ^{Ab}	56,2 ± 0,6 ^{Aa}	42,1 ± 1,3 ^{Ac}	59,5 ± 1,0 ^{Ab}	73,2 ± 0,6 ^{Aa}	37,1 ± 1,3 ^{Ca}	12,9 ± 1,2 ^{Cb}	13,3 ± 1,2 ^{Cb}
ESBF – emulsão com concentrado de soro bovino fresco									
Proteína	IAE (m ² /g)			IEE (%)			IC (%)		
	pH = 3,0	pH = 5,0	pH = 7,0	pH = 3,0	pH = 5,0	pH = 7,0	pH = 3,0	pH = 5,0	pH = 7,0
0,5	28,7 ± 0,9 ^{Cc}	40,5 ± 0,9 ^{Cb}	48,3 ± 1,1 ^{Ca}	34,4 ± 0,7 ^{Bc}	52,3 ± 0,7 ^{Cb}	61,3 ± 0,8 ^{Da}	50,6 ± 1,6 ^{Aa}	19,6 ± 1,4 ^{Ab}	20,5 ± 1,5 ^{Ab}
1,0	29,6 ± 0,6 ^{BCc}	41,8 ± 1,3 ^{BCb}	50,2 ± 1,3 ^{Ca}	35,6 ± 0,9 ^{Bc}	54,6 ± 0,9 ^{Bb}	64,4 ± 1,3 ^{Ca}	47,3 ± 1,8 ^{ABa}	18,5 ± 1,1 ^{ABb}	18,3 ± 0,9 ^{ABb}
1,5	30,9 ± 0,8 ^{Bc}	43,1 ± 0,6 ^{Bb}	52,6 ± 0,7 ^{Ba}	36,2 ± 1,1 ^{Bc}	56,3 ± 1,1 ^{Bb}	67,7 ± 0,9 ^{Ba}	44,9 ± 1,5 ^{Ba}	16,5 ± 1,3 ^{BCb}	16,8 ± 0,8 ^{Bb}
2,0	33,6 ± 1,3 ^{Ac}	44,9 ± 0,9 ^{Ab}	54,4 ± 0,9 ^{Aa}	38,9 ± 1,2 ^{Ac}	58,6 ± 0,9 ^{Ab}	69,5 ± 1,2 ^{ABa}	39,6 ± 1,3 ^{Ca}	14,2 ± 0,7 ^{Db}	13,6 ± 1,2 ^{Cb}
2,5	32,8 ± 0,8 ^{Ac}	45,3 ± 1,3 ^{Ab}	55,3 ± 1,2 ^{Aa}	39,3 ± 1,4 ^{Ac}	58,5 ± 0,8 ^{Ab}	70,1 ± 1,4 ^{Aa}	40,6 ± 1,2 ^{Ca}	13,9 ± 1,1 ^{Db}	13,8 ± 1,3 ^{Cb}
3,0	32,4 ± 0,7 ^{Ac}	44,6 ± 0,8 ^{Ab}	54,7 ± 0,9 ^{Aa}	38,9 ± 0,9 ^{Ac}	59,1 ± 1,2 ^{Ab}	69,9 ± 0,8 ^{Aa}	39,1 ± 1,9 ^{Ca}	14,5 ± 1,2 ^{CDB}	13,5 ± 0,9 ^{Cb}
ESCF – emulsão com concentrado de soro caprino fresco									
Proteína	IAE (m ² /g)			IEE (%)			IC (%)		
	pH = 3,0	pH = 5,0	pH = 7,0	pH = 3,0	pH = 5,0	pH = 7,0	pH = 3,0	pH = 5,0	pH = 7,0
0,5	32,3 ± 1,3 ^{Cc}	47,3 ± 1,2 ^{Cb}	59,4 ± 1,2 ^{Ca}	44,1 ± 1,1 ^{Cc}	60,5 ± 0,9 ^{Bb}	74,1 ± 1,2 ^{Ca}	31,6 ± 1,4 ^{Aa}	15,5 ± 1,5 ^{Ab}	15,2 ± 1,2 ^{Ab}
1,0	36,6 ± 1,2 ^{Bc}	50,9 ± 1,4 ^{Bb}	62,6 ± 0,9 ^{Ba}	45,3 ± 1,3 ^{BCc}	62,6 ± 1,3 ^{Bb}	75,6 ± 0,8 ^{Ba}	29,9 ± 1,6 ^{ABa}	12,9 ± 1,3 ^{Ab}	13,2 ± 1,4 ^{Ab}
1,5	39,8 ± 1,4 ^{Ac}	55,7 ± 1,3 ^{Ab}	68,7 ± 1,6 ^{Aa}	48,7 ± 0,9 ^{Ac}	66,3 ± 1,4 ^{Ab}	77,8 ± 0,9 ^{Aa}	26,5 ± 1,1 ^{Ca}	10,2 ± 0,9 ^{Bb}	8,8 ± 1,3 ^{Bb}
2,0	41,4 ± 1,1 ^{Ac}	57,4 ± 1,1 ^{Ab}	69,6 ± 1,3 ^{Aa}	48,6 ± 1,2 ^{Ac}	67,7 ± 0,9 ^{Ab}	77,6 ± 0,7 ^{Aa}	26,9 ± 1,7 ^{BCa}	9,7 ± 1,1 ^{Bb}	9,7 ± 0,8 ^{Bb}
2,5	42,2 ± 1,2 ^{Ac}	56,7 ± 0,9 ^{Ab}	70,2 ± 1,4 ^{Aa}	47,4 ± 1,1 ^{ABc}	66,8 ± 1,1 ^{Ab}	78,2 ± 0,9 ^{Aa}	27,2 ± 1,3 ^{BCa}	10,4 ± 0,8 ^{Bb}	10,2 ± 1,1 ^{Bb}
3,0	40,5 ± 0,8 ^{Ac}	57,1 ± 0,8 ^{Ab}	69,5 ± 1,2 ^{Aa}	48,2 ± 0,9 ^{Ac}	67,2 ± 0,7 ^{Ab}	77,9 ± 1,1 ^{Aa}	26,8 ± 1,8 ^{BCa}	10,3 ± 1,2 ^{Bb}	8,9 ± 0,9 ^{Bb}

ESBUF – emulsão com concentrado de soro bubalino fresco

Proteína	IAE (m ² /g)			IEE (%)			IC (%)		
	pH = 3,0	pH = 5,0	pH = 7,0	pH = 3,0	pH = 5,0	pH = 7,0	pH = 3,0	pH = 5,0	pH = 7,0
0,5	29,6 ± 1,2 ^{Bc}	44,6 ± 0,6 ^{Cb}	52,2 ± 1,5 ^{Ca}	37,6 ± 0,9 ^{Bc}	56,4 ± 0,8 ^{Cb}	72,3 ± 0,6 ^{Ca}	39,4 ± 1,2 ^{Aa}	16,2 ± 1,1 ^{Ab}	17,4 ± 1,3 ^{Ab}
1,0	31,4 ± 1,3 ^{Bc}	47,9 ± 1,2 ^{Bb}	55,8 ± 1,2 ^{Ba}	39,4 ± 1,2 ^{Bc}	57,9 ± 1,1 ^{BCb}	73,9 ± 0,7 ^{Ba}	37,6 ± 1,5 ^{Aa}	14,6 ± 1,3 ^{ABb}	15,6 ± 1,2 ^{Ab}
1,5	34,9 ± 1,4 ^{Ac}	50,7 ± 0,9 ^{Ab}	59,9 ± 1,3 ^{Aa}	43,2 ± 1,1 ^{Ac}	59,6 ± 0,7 ^{ABb}	76,8 ± 1,2 ^{Aa}	32,5 ± 0,9 ^{Ba}	12,4 ± 1,1 ^{BCb}	11,4 ± 1,1 ^{Bb}
2,0	37,2 ± 0,9 ^{Ac}	52,5 ± 1,2 ^{Ab}	60,2 ± 1,1 ^{Aa}	42,8 ± 1,2 ^{Ac}	60,2 ± 1,3 ^{Ab}	76,5 ± 1,4 ^{Aa}	31,9 ± 1,4 ^{Ba}	11,7 ± 1,4 ^{Cb}	12,6 ± 1,5 ^{Bb}
2,5	37,6 ± 1,5 ^{Ac}	52,9 ± 1,3 ^{Ab}	60,6 ± 1,3 ^{Aa}	42,1 ± 0,7 ^{Ac}	60,5 ± 1,2 ^{Ab}	77,1 ± 0,9 ^{Aa}	32,4 ± 1,2 ^{Ba}	12,1 ± 0,9 ^{Cb}	12,1 ± 1,2 ^{Bb}
3,0	36,3 ± 0,8 ^{Ac}	51,6 ± 0,8 ^{Ab}	59,5 ± 0,9 ^{Aa}	41,8 ± 0,9 ^{Ac}	60,3 ± 0,9 ^{Ab}	75,9 ± 1,3 ^{ABa}	32,8 ± 1,1 ^{Ba}	11,9 ± 0,8 ^{Cb}	11,8 ± 0,9 ^{Bb}

Valores são médias ± desvio padrão.

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, sendo maiúscula na coluna e minúscula na linha, de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

IAE = índice de atividade emulsificante; IEE = índice de estabilidade da emulsão; IC = índice de formação de creme.

Observou-se que as emulsões preparadas a pH 7,0 apresentaram melhor desempenho para os parâmetros índice de atividade (IAE) e de estabilidade da emulsão (IEE), independente da amostra de concentrado proteico utilizada. Para o IAE, foram verificados valores de 56,2, 54,7, 69,5 e 59,5% para as emulsões a pH 7,0 e com 3% de concentrado proteico de soro bovino reconstituído e soros frescos bovino, caprino e bubalino, respectivamente. Enquanto que para pH 3,0 os valores de IAE observados foram 34,5, 32,4, 40,5 e 36,3% para as mesmas amostras.

O parâmetro IEE a pH 7,0, variou, por exemplo, entre 74,1 e 78,2% para a amostra com concentrado de soro caprino, dependendo da concentração proteica empregada. Para a mesma amostra, o IEE a pH 3,0 foi significativamente inferior, com valores entre 44,1 e 48,7%, conforme a concentração de proteína adotada.

Os resultados obtidos nesta pesquisa estão de acordo com os reportados por Sanmartín et al. (2013), que ao avaliarem as propriedades funcionais de concentrados proteicos de soro de cabra obtidos por UF e posterior liofilização, observaram maior atividade emulsificante a pH 7 (60,2%) do que a pH 4 (48,5%). O mesmo foi verificado para a estabilidade da emulsão, com valores de 99,1 e 95,8%, para pH 7,0 e 4,0, respectivamente.

Ao avaliar o índice de formação de creme após 24 h de obtenção das emulsões, constatou-se valores significativamente menores, ou seja, maior estabilidade, a pH 5,0 e 7,0 para todas as amostras estudadas, em comparação ao pH 3,0. Entre os pHs 5,0 e 7,0 não houve diferença estatística. Possivelmente, estes resultados são explicados pelo fato de que o pH baixo (3,0) causou mudanças estruturais nas moléculas de proteínas, diminuindo assim as propriedades emulsificantes dos concentrados proteicos. Em geral, as emulsões são menos estáveis abaixo do ponto isoelétrico, apresentando maior tendência à floculação e formação de creme.

Zhu et al. (2017), que estudaram as propriedades reológicas de emulsões preparadas a diferentes valores de pH, relataram obtenção de emulsões mais estáveis, principalmente quanto à viscosidade, em valores de pH próximos ao ponto isoelétrico das proteínas (5,0 e 6,8). Segundo os autores, nestes valores de pH o tamanho das partículas foi menor e sua distribuição foi mais uniforme.

A estabilidade à formação de creme das emulsões estabilizadas por WPC, avaliadas por Owens et al. (2018), também demonstrou ser superior em pH 7,0 após 24 h da obtenção das emulsões. Enquanto que Sriprabhom et al. (2018) relataram

maior estabilidade à formação de creme a pH 5,0, 6,0 e 7,0, quando comparada às emulsões preparadas a pH 3,0 e 4,0, em baixas concentrações de sal.

Quanto à concentração de WPC na emulsão, observou-se maior atividade emulsificante e estabilidade da emulsão conforme mais elevada era a concentração de proteínas. Comportamento inverso foi verificado para o índice de formação de creme. Verificou-se ainda, que a partir do teor de 2,0% de proteínas, não houve melhora significativa nos parâmetros avaliados, para as amostras de origem bovina. Enquanto que ao utilizar os concentrados de origem caprina e bubalina, a partir do teor de proteínas de 1,5% já não houve impacto significativo nos dados, sendo esta concentração suficiente para proporcionar os melhores resultados alcançados.

Portanto, estes resultados demonstram que as proteínas provenientes dos soros de leite de cabra e de búfala podem ser utilizadas no preparo de emulsões em menor concentração, e, ainda assim, serão capazes de conferir estabilidade igual ou superior às emulsões obtidas com proteínas lácteas de origem bovina. Ao comparar os resultados entre as amostras, verificou-se desempenho na ordem ESCF > ESBUF > ESBR > ESBF, para todos os parâmetros analisados.

Além disso, estes resultados corroboram com os achados de Sanmartín et al. (2013), onde verificou-se maior IAE e IEE para o concentrado proteico do soro caprino em relação ao concentrado de origem bovina. De acordo com os autores, o ocorrido pode estar relacionado com a menor solubilidade das proteínas de origem bovina, propriedade fortemente correlacionada com a estabilidade da emulsão.

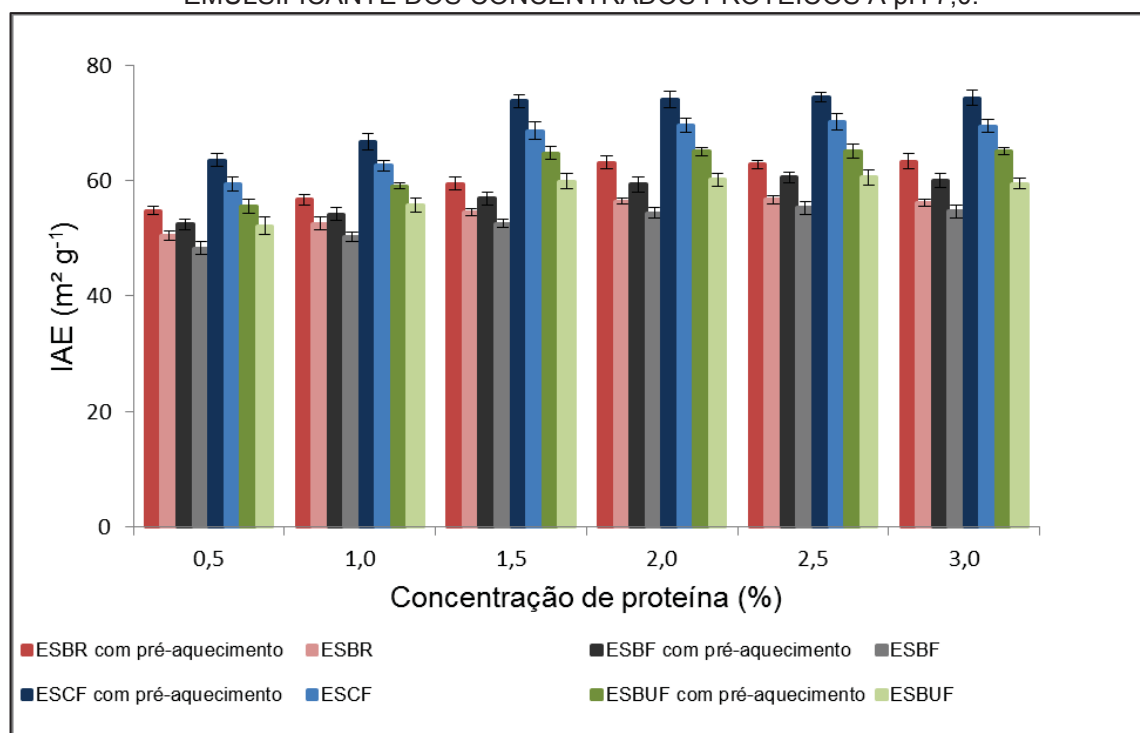
4.3.2 Impacto do tratamento térmico na estabilidade das emulsões

Inicialmente, avaliou-se o efeito do tratamento térmico das soluções proteicas (pH 7,0), a 80 °C durante 20 min, antes do preparo das emulsões. O pré-aquecimento das soluções resultou em emulsões com IAE e IEE conforme mostram as Figuras 26 e 27, respectivamente.

Como pode ser observado, a realização do pré-aquecimento das soluções propiciou melhora na atividade emulsificante, bem como na estabilidade da emulsão, em relação a amostra controle, para todos os concentrados proteicos. Apesar do

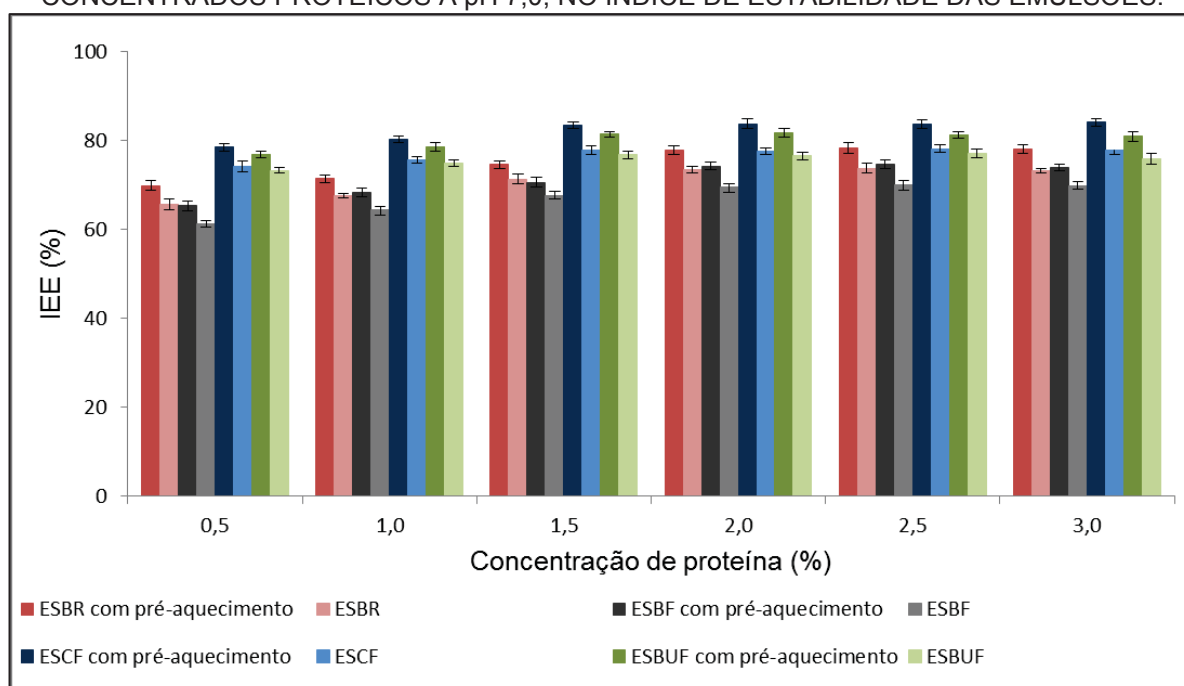
aumento nos valores de IAE e IEE terem sido sutis, todos foram estatisticamente significativos.

FIGURA 26 - INFLUÊNCIA DO PRÉ-AQUECIMENTO A 80 °C, DURANTE 20 MIN, NA ATIVIDADE EMULSIFICANTE DOS CONCENTRADOS PROTEICOS A pH 7,0.



Fonte: A autora (2020).

FIGURA 27 - INFLUÊNCIA DO PRÉ-AQUECIMENTO A 80 °C, DURANTE 20 MIN, DOS CONCENTRADOS PROTEICOS A pH 7,0, NO ÍNDICE DE ESTABILIDADE DAS EMULSÕES.



Fonte: A autora (2020).

Na emulsão preparada com o concentrado de soro de cabra fresco, o qual apresentou o melhor desempenho, o valor observado para o índice de atividade emulsificante (IAE) para a amostra submetida ao aquecimento foi de $73,8 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, enquanto que para a amostra controle, aquela que não foi submetida ao pré-aquecimento, foi de $68,7 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, ambas a pH 7,0 e concentração proteica de 1,5%. Enquanto que os valores para o índice de estabilidade da emulsão (IEE), nas mesmas condições experimentais, foram de 83,5 e 77,8%, para o concentrado de soro caprino com e sem pré-aquecimento, respectivamente.

O aumento na estabilidade à formação de creme também foi verificado nas amostras submetidas ao pré-aquecimento a 80°C por 20 min, como pode ser conferido na Tabela 28. O índice de formação de creme foi avaliado após 24 h de obtenção das emulsões, onde se constatou diminuição dos valores em torno de 25%, quando comparados às amostras controle.

TABELA 28 - ÍNDICE DE FORMAÇÃO DE CREME (%) A pH 7,0 E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE 2,0% (ESBR E ESBF) E 1,5% (ESCF E ESBUF).

Amostra	Controle	Com pré-aquecimento
ESBR	$12,7 \pm 0,9^a$	$9,6 \pm 0,6^b$
ESBF	$13,6 \pm 1,2^a$	$10,7 \pm 1,1^b$
ESCF	$8,8 \pm 1,3^a$	$5,9 \pm 0,9^b$
ESBUF	$11,4 \pm 1,1^a$	$8,8 \pm 0,7^b$

Valores são médias \pm desvio padrão.

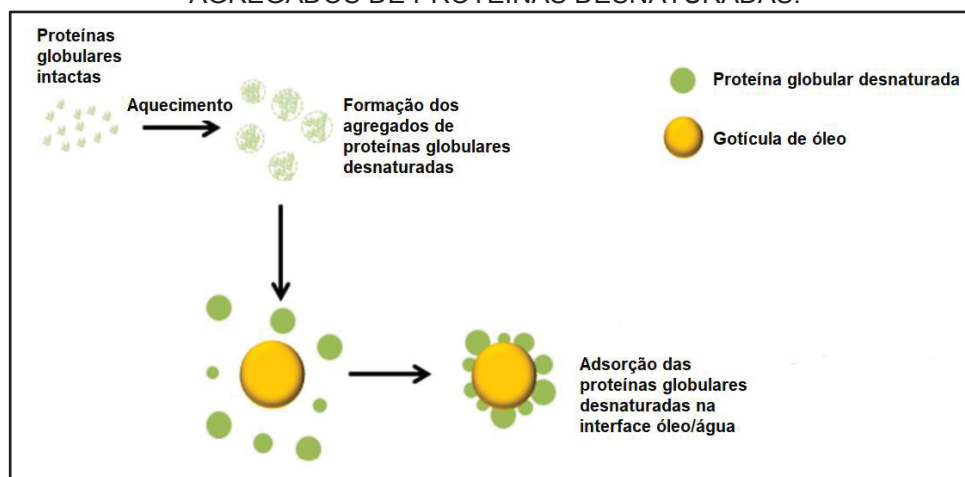
Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

As alterações que foram observadas nas propriedades emulsificantes dos concentrados são resultado da desnaturação das proteínas do soro, ocorrida ao realizar o aquecimento das mesmas a 80°C . Segundo a literatura, a desnaturação acima de 70°C faz com que as proteínas globulares do soro sofram desdobramento de sua estrutura e, conseqüentemente, tenham suas propriedades modificadas devido à exposição de grupos hidrofóbicos (LIANG et al., 2013, 2017; RAIKOS, 2010). Ainda segundo estes autores, o aumento na hidrofobicidade da superfície, induzido pelo calor, pode resultar em mudança do tamanho das partículas, alterações em sua estabilidade e aumento da viscosidade da emulsão.

O tratamento térmico forma pequenos agregados das principais proteínas do soro, β -Lg e α -La, que, com o aumento da temperatura ou do tempo de aquecimento, se tornam maiores devido à formação de complexos entre as

proteínas desnaturadas (JANG; SWAISGOOD, 1990). A Figura 28 ilustra um esquema dos agregados de proteínas adsorvidos na superfície das gotículas de óleo da emulsão.

FIGURA 28 - ESQUEMA DA ESTABILIZAÇÃO DA INTERFACE ÓLEO/ÁGUA PELA ADSORÇÃO DE AGREGADOS DE PROTEÍNAS DESNATURADAS.

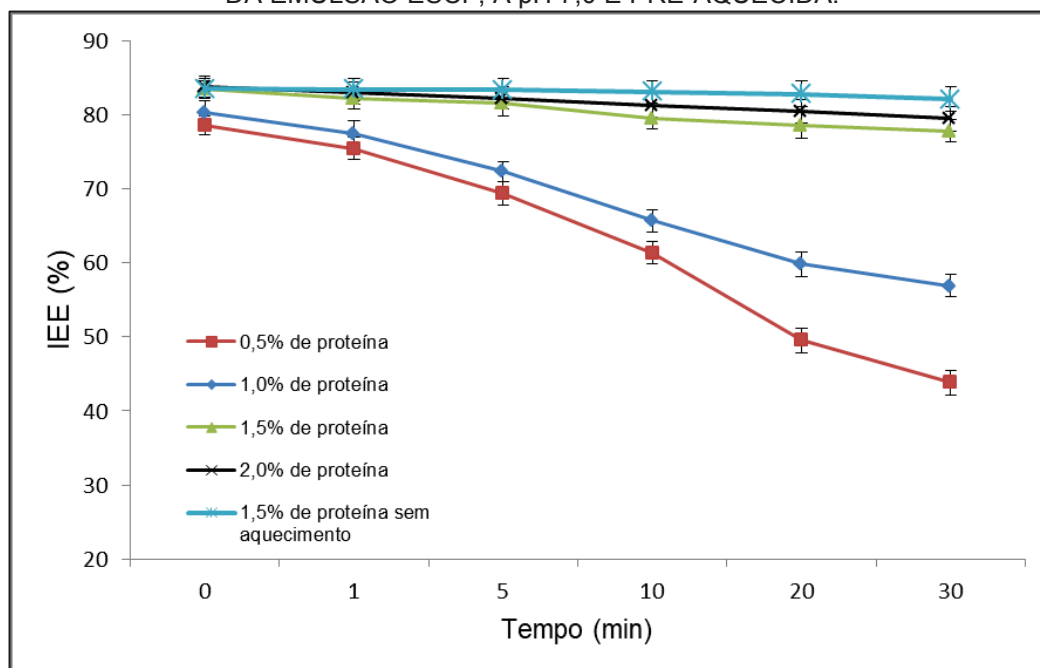


Fonte: Adaptado de LIANG et al. (2017).

No estudo de Guggisberg et al. (2012), que avaliaram o efeito do tratamento térmico a 60, 75 e 90 °C em amostras de leite antes da homogeneização com óleo de girassol, foi verificado efeito de aquecimento benéfico às emulsões. A amostra aquecida a 90 °C resultou em emulsão significativamente mais estável e com gotículas menores em comparação com as emulsões com amostras aquecidas a 60 e 75 °C. Emulsões estabilizadas com proteínas isoladas do soro (MOHAMMADIAN et al., 2018; SUN et al., 2018) e proteínas concentradas do leite (LIANG et al., 2013) também demonstraram ser mais estáveis quando as soluções foram submetidas a pré-aquecimento.

O conhecimento da estabilidade térmica das emulsões após a homogeneização também é essencial, uma vez que as emulsões alimentícias obtidas a pH neutro (6,5-7,0) são frequentemente submetidas a tratamento térmico, que visa alcançar prazos de validade prolongados (LIANG et al., 2017). Logo, as emulsões mais estáveis previamente obtidas, ou seja, aquelas preparadas a pH 7,0 e pré-aquecidas, foram avaliadas quanto à estabilidade ao tratamento térmico a 90 °C durante os tempos de 1, 5, 10, 20 e 30 min. A concentração de proteínas foi avaliada entre 0,5 e 2,0%. Os resultados obtidos para emulsão com concentrado proteico de soro de leite de cabra, ESCF, estão ilustrados na Figura 29.

FIGURA 29 - EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO PÓS-HOMOGENEIZAÇÃO NA ESTABILIDADE DA EMULSÃO ESCF, A pH 7,0 E PRÉ-AQUECIDA.



Fonte: A autora (2020).

Observou-se para a amostra de ESCF diminuição significativa na estabilidade da emulsão, ao longo dos 30 min de aquecimento a 90 °C, em relação à amostra controle, apenas para as concentrações proteicas de 0,5 e 1,0%. Para a concentração de proteínas de 1,5%, houve redução significativa do IEE somente a partir de 10 min de aquecimento. A amostra de ESCF com 2,0% de proteínas não apresentou alteração significativa no IEE em relação à amostra controle que continha concentração de 1,5%.

Assim, após 30 min de tratamento térmico, a emulsão com concentrado de soro de cabra apresentou perda de sua estabilidade em torno de 44,2; 29,1; 6,8 e 5,2% quando empregadas as concentrações proteicas de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0%, respectivamente. Portanto, pode-se concluir que o aumento na concentração de proteínas proporciona maior estabilidade térmica à emulsão.

De acordo com Liang et al. (2013), a desnaturação das proteínas do soro antes da emulsificação pode ter efeito benéfico na estabilidade ao calor das emulsões. Segundo os autores, provavelmente a pré-desnaturação das proteínas do soro as tornou relativamente inerte durante um tratamento térmico secundário. Por isso, observaram-se reduções inferiores a 10% no IEE para amostras com 1,5 ou 2,0% de proteína.

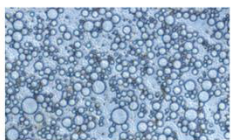
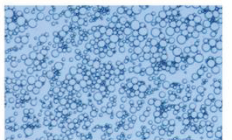
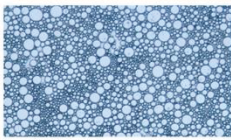
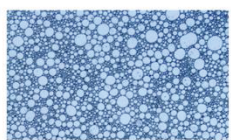
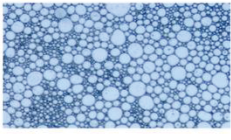
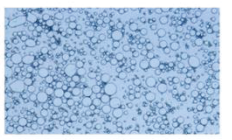
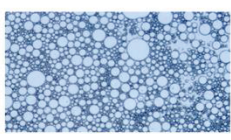
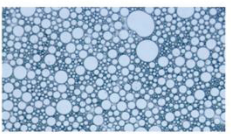
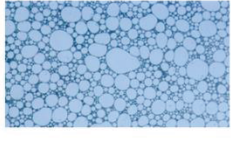
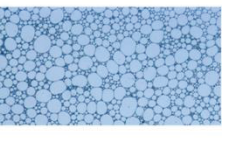
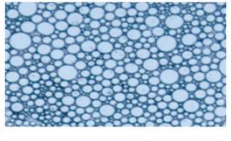
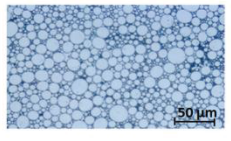
Para a amostra de concentrado proteico de soro bubalino foi observado o mesmo comportamento, com redução da estabilidade de 7,2 e 5,0%, após 30 min de aquecimento, para as amostras com concentração de proteína de 1,5 e 2,0%, respectivamente. Para as emulsões preparadas com concentrados de origem bovina foi identificado o mesmo comportamento sobre o IEE com relação às concentrações de proteínas. No entanto, as reduções observadas sobre este parâmetro foram mais expressivas. Para a amostra de ESBF, por exemplo, a redução no índice de estabilidade, após os 30 min de tratamento térmico, foi de 9,3% para concentração proteica de 1,5% e de 6,8% para a amostra com 2,0% de proteína. Estes resultados corroboram as descobertas anteriores desta pesquisa, de que os concentrados bovinos necessitam ser adicionados em maior concentração para que possam estabilizar as emulsões O/A.

4.3.3 Análise microscópica e distribuição do tamanho de gota

A análise microscópica das emulsões foi realizada imediatamente após o seu preparo e em 24 h e 7 dias, com armazenamento das amostras a 23 °C, sendo obtidas as micrografias apresentadas no Quadro 1.

Observou-se para todas as emulsões analisadas, que ao longo do tempo de armazenamento há aumento do tamanho das gotas formadas, o que caracteriza a ocorrência de coalescência das gotículas de óleo. Pode-se visualizar também, que as amostras preparadas com concentrados de origem bovina apresentaram gotículas não esféricas após os 7 dias de armazenamento, tornando-se cada vez mais irregulares. As amostras de ESCF e ESBUF, apesar de demonstrarem aumento do tamanho, mantiveram o formato das gotículas mais esférico. Estes aspectos observados indicam que as amostras ESBR e ESBF continuam coalescendo de forma mais intensa durante o período analisado e são consistentes com os demais resultados, que indicavam maior estabilidade para as amostras com proteínas de soro de leite de cabra e búfala.

QUADRO 1 - MICROGRAFIAS DAS EMULSÕES PREPARADAS A pH 7,0, PRÉ-AQUECIDAS, COM CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE 2,0% (ESBR E ESBF) E 1,5% (ESCF E ESBUF) - AUMENTO DE 160x.

Tempo	Amostra			
	ESBR	ESBF	ESCF	ESBUF
0				
24 h				
7 dias				

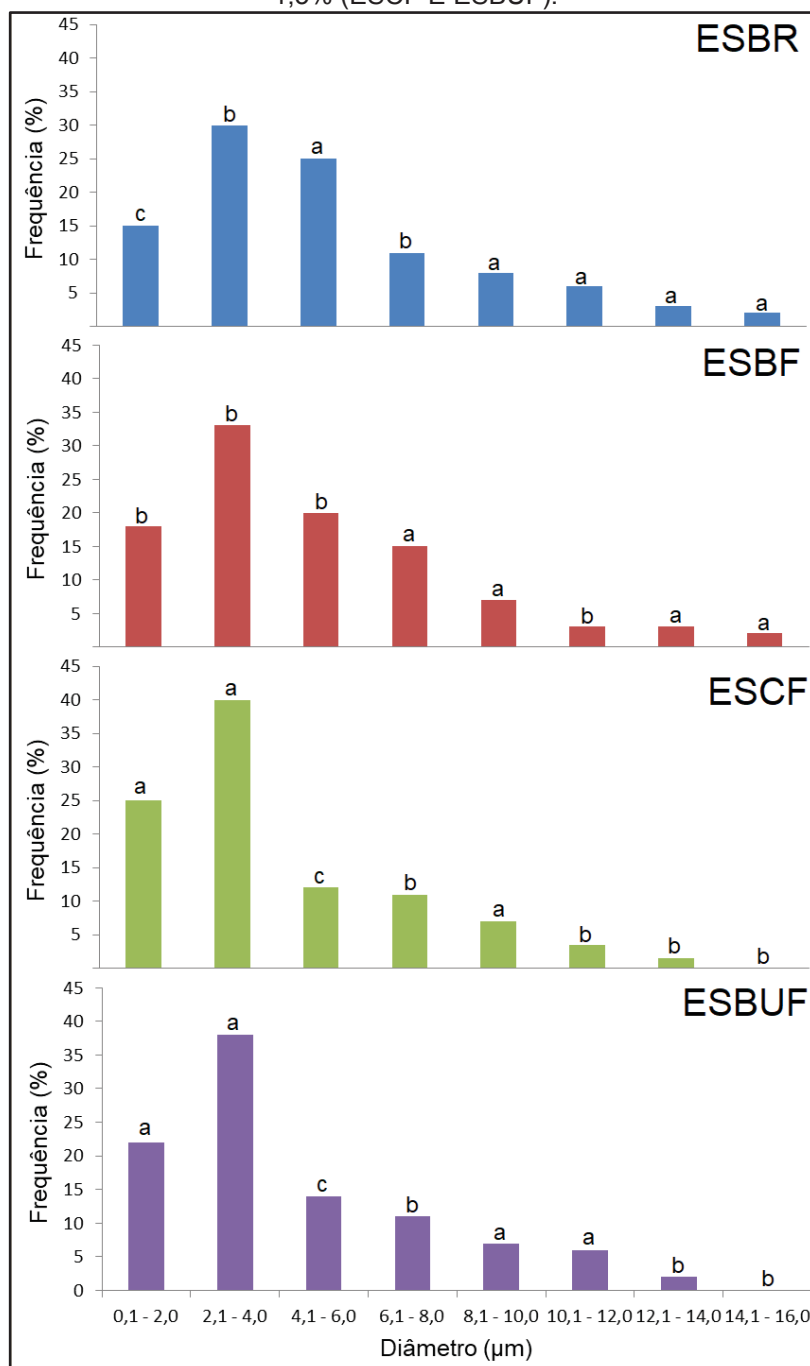
Fonte: A autora (2020).

A partir das micrografias apresentadas, pode-se verificar também que há maior população de pequenas gotículas para as emulsões ESCF e ESBUF logo após o seu preparo, o que está de acordo com os valores obtidos anteriormente para o índice de atividade e de estabilidade destas amostras. O tamanho das gotículas de óleo interfere fortemente na estabilidade das emulsões, sendo que gotas menores e mais homogêneas são indicativo de emulsões mais estáveis, enquanto que gotas maiores estão mais suscetíveis à sedimentação, floculação ou coalescência (TADROS, 2013).

A distribuição do tamanho de gotas (DTG) de cada amostra, logo após a homogeneização, pode ser verificada na Figura 30. Observou-se comportamento semelhante da distribuição do tamanho de gotas para todas as emulsões avaliadas, obtendo-se entre 70 e 77% da DTG com gotas de diâmetro inferior ou igual a 6 µm. No entanto, as emulsões obtidas a partir de proteínas concentradas de origem bovina, aquelas menos estáveis conforme todas as demais análises, apresentaram maior frequência de gotas maiores. A amostra ESBR, por exemplo, apresentou 11% de sua DTG superior a 10 µm, enquanto a amostra com proteínas de soro de cabra exibiu 5% de sua DTG acima desta faixa de diâmetro. Além disso, verificou-se maior frequência de gotas pequenas, inferiores a 4 µm, para as emulsões ESCF e ESBUF

em comparação às amostras bovinas, reafirmando o resultado visualizado nas micrografias.

FIGURA 30 - DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE GOTAS (DTG) DAS EMULSÕES PREPARADAS A pH 7,0, PRÉ-AQUECIDAS, COM CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE 2,0% (ESBR E ESBF) E 1,5% (ESCF E ESBUF).



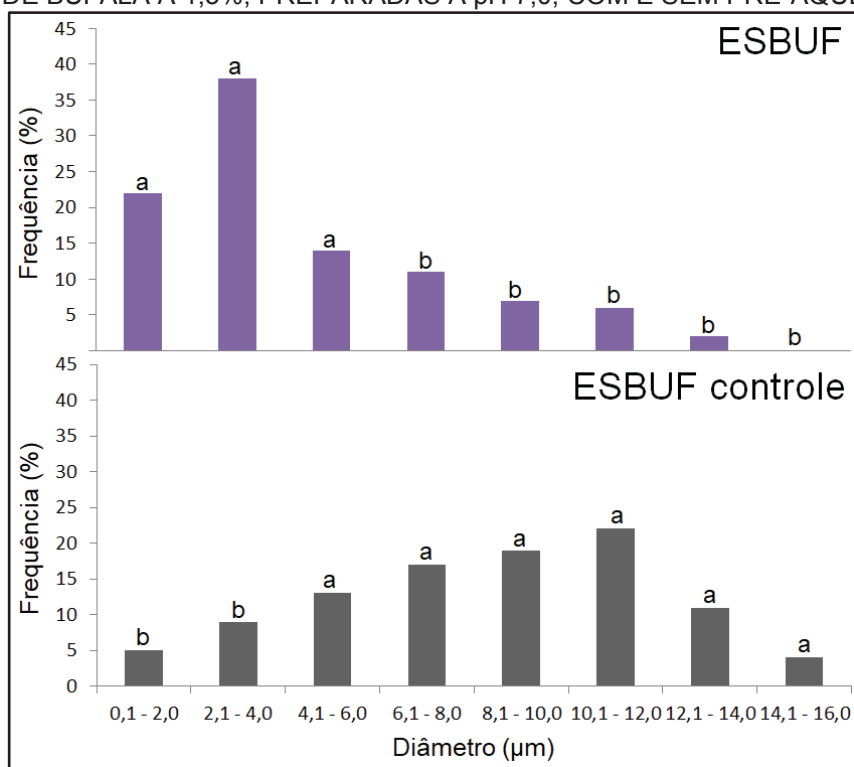
Letras iguais indicam que não há diferença estatística entre as amostras na mesma faixa de diâmetro, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: A autora (2020).

Os resultados de tamanho de gotas verificados neste estudo também são semelhantes a outras pesquisas recentes. Chevallier et al. (2018) relataram, em seu estudo de emulsão com proteínas do soro e caseína, maior distribuição do tamanho de gotas em torno de 1,5 μm . Enquanto que emulsões com proteínas do soro e goma xantana, obtidas por Sriprablom et al. (2018), resultaram em maior frequência de diâmetros próximos a 2 μm . A pesquisa de Owens et al. (2018), por sua vez, observou tamanhos inferiores a 5 μm , para emulsão formada com proteínas do soro e gomas xantana e locusta.

No presente estudo, o tamanho de gotas ainda foi avaliado para as amostras controle, ou seja, aquelas que não foram submetidas ao pré-aquecimento da solução proteica. Sendo apresentado na Figura 31, a DTG para a emulsão obtida a partir do soro de búfala, com e sem pré-aquecimento.

FIGURA 31 - DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE GOTAS (DTG) DE EMULSÕES COM PROTEÍNAS DO SORO DE BÚFALA A 1,5%, PREPARADAS A pH 7,0, COM E SEM PRÉ-AQUECIMENTO.



Fonte: A autora (2020).

Como pode ser visualizado, a amostra controle de ESBUF apresentou mais de 50% de sua DTG acima de 8,1 μm . Em contrapartida, o tratamento térmico pré-homogeneização para esta mesma amostra, a 80 °C durante 20 min, resultou em mais de 70% da DTG abaixo de 6 μm .

Os resultados desta análise corroboram com os dados apresentados no subitem 4.3.2, onde foi observado que o pré-aquecimento das soluções proporciona aumento da atividade emulsificante e da estabilidade da emulsão, os quais são resultados da ocorrência da maior população de gotas menores durante a homogeneização. De acordo com Liang et al. (2013), o pré-aquecimento das proteínas confere ligeiro efeito benéfico às emulsões, reduzindo o tamanho das gotículas e resultando em distribuições de tamanho de gotas mais estreitas. Ainda segundo estes autores, as proteínas do soro desnaturadas podem resultar em menor agregação, pois menos grupos tiol livres estão disponíveis.

4.3.4 Influência da razão de surfatante na estabilidade das emulsões

A fim de avaliar o efeito da adição do surfatante comercial na estabilidade das emulsões, as mesmas foram preparadas com a mistura de surfatantes, proteínas concentradas do soro + Tween 80, em diferentes proporções, resultando nos dados apresentados pela Tabela 29. Estes ensaios foram realizados com as soluções de proteínas pré-aquecidas e a pH 7,0.

TABELA 29 - INFLUÊNCIA DA RAZÃO DE SURFATANTE NA ESTABILIDADE DAS EMULSÕES.

Proteína - Tween 80 (%)	IEE (%)			
	ESBR	ESBF	ESCF	ESBUF
2,0 - 0,0	77,8 ± 0,9 ^B	74,3 ± 0,8 ^B	83,8 ± 0,8 ^C	81,7 ± 0,6 ^C
1,5 - 0,5	78,2 ± 1,2 ^B	75,6 ± 1,4 ^B	85,6 ± 0,7 ^B	83,2 ± 0,7 ^B
1,0 - 1,0	81,8 ± 0,7 ^A	78,5 ± 0,7 ^A	87,7 ± 0,9 ^A	86,5 ± 1,2 ^A
0,5 - 1,5	82,1 ± 0,8 ^A	79,3 ± 1,3 ^A	88,7 ± 1,2 ^A	87,2 ± 0,9 ^A
0,0 - 2,0	82,8 ± 1,3 ^A	79,4 ± 0,9 ^A	88,1 ± 0,7 ^A	87,1 ± 0,8 ^A

Valores são médias ± desvio padrão.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

Pode-se observar que a adição do surfatante Tween 80 teve efeito positivo na estabilidade das emulsões. Pois, à medida que se aumentou a proporção do surfatante sintético em relação às proteínas do soro, maior foi o IEE. Contudo, conforme se aumentava a proporção do Tween 80, a partir da razão 1:1, não foi mais observado acréscimo significativo no IEE. Sendo, as razões de

proteína:surfatante de 1:1, 0,5:1,5 e 0:2 consideradas estatisticamente iguais quanto ao seu efeito na estabilidade das emulsões, para as diferentes amostras analisadas.

Na pesquisa de Gomes et al. (2018), constatou-se que a adição de Tween 80 levou a redução da tensão interfacial água-óleo e que sua combinação com o WPI é capaz de produzir emulsões estáveis, além de ser possível a utilização de menor concentração de compostos sintéticos.

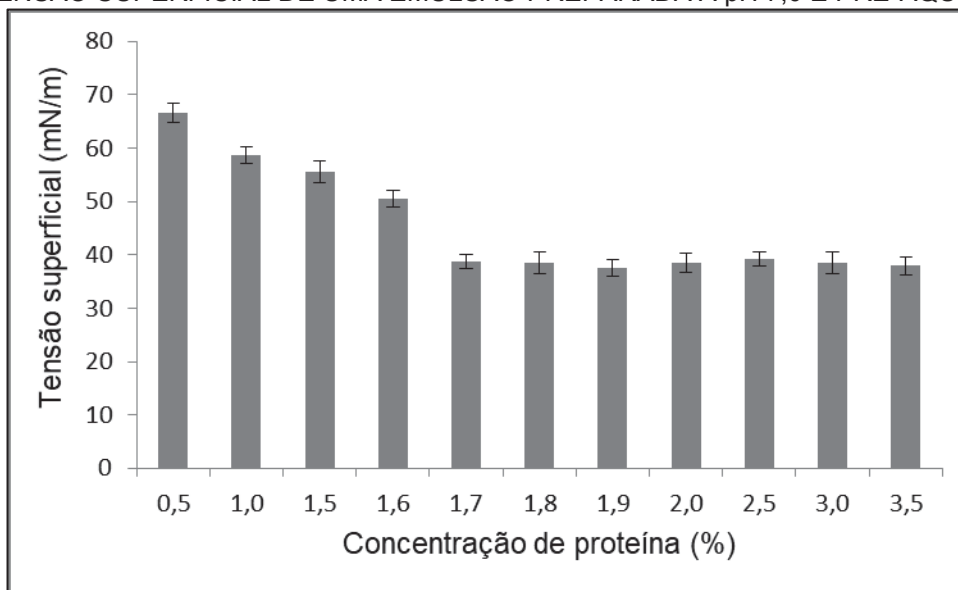
Os resultados observados evidenciam que as proteínas concentradas a partir de soro de leite, obtidas de diferentes origens, podem ser utilizadas juntamente com o surfatante sintético, diminuindo a concentração necessária deste último para estabilização de emulsões O/A.

4.3.5 Tensão superficial

A tensão superficial foi avaliada para todas as emulsões com os diferentes tipos de soro de leite. Porém, como os resultados obtidos foram similares, estão sendo apresentados, na Figura 32, apenas aqueles observados para a emulsão preparada com proteínas concentradas a partir do soro de cabra.

Inicialmente, mediu-se a tensão superficial da emulsão em intervalos de 0,5% (m/v) de concentração de proteína e então foram adotados intervalos de 0,1% para melhor exatidão do valor de concentração micelar crítica (CMC). Observou-se que a tensão superficial apresentou declínio até a aplicação de 1,7% de proteínas, reduzindo de $66,57 \pm 1,87$ para $38,66 \pm 1,31$ mN/m, e se manteve estabilizada a partir desta concentração. Assim, a adição de 1,7% de proteína do soro de leite de cabra é suficiente para atingir a CMC, ou seja, não há mais interferência do tensoativo utilizado sobre a tensão superficial da emulsão mesmo que este venha a ser acrescentado em concentrações mais elevadas.

FIGURA 32 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SORO DE LEITE DE CABRA NA TENSÃO SUPERFICIAL DE UMA EMULSÃO PREPARADA A pH 7,0 E PRÉ-AQUECIDA.



Fonte: A autora (2020).

A influência da concentração de proteínas sobre a estabilidade das emulsões, verificada pelos índices de estabilidade e de formação de creme, a qual foi apresentada anteriormente (subitem 4.3.1), já demonstrava que não havia necessidade da adição de 2% de proteína para a emulsão elaborada a partir do soro de cabra. No entanto, acreditava-se que 1,5% era suficiente para garantir a estabilização da emulsão, o que foi verificado, a partir da medição com intervalo reduzido de 0,1% (m/v), ser mais precisamente 1,7% de proteínas, para a emulsão estudada.

Para a emulsão obtida a partir de proteínas do soro de búfala foi observada a mesma concentração micelar crítica, de 1,7%. Enquanto que para as amostras de soro de origem bovina, a CMC de proteínas foi de 2,1%.

Ainda com relação à análise de tensão superficial, esta foi investigada para emulsões preparadas com solução de proteína com e sem pré-aquecimento, Tabela 30. Os resultados obtidos demonstraram que as amostras que foram submetidas ao pré-aquecimento a 80 °C, durante 20 min, possuem maior capacidade de atuar reduzindo a tensão superficial. De acordo com a literatura, proteínas do soro tratadas termicamente possuem maior atividade superficial em comparação a proteínas nativas devido ao desdobramento parcial da estrutura da proteína que ocorre durante a desnaturação (MOHAMMADIAN et al., 2018; TOMCZYŃSKA-MLEKO et al., 2014).

TABELA 30 - MEDIDAS DE TENSÃO SUPERFICIAL (mN/m) OBTIDAS QUANDO APLICADA A CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE 2,1% (ESBR E ESBF) E 1,7% (ESCF E ESBUF) EM EMULSÕES PREPARADAS A pH 7,0.

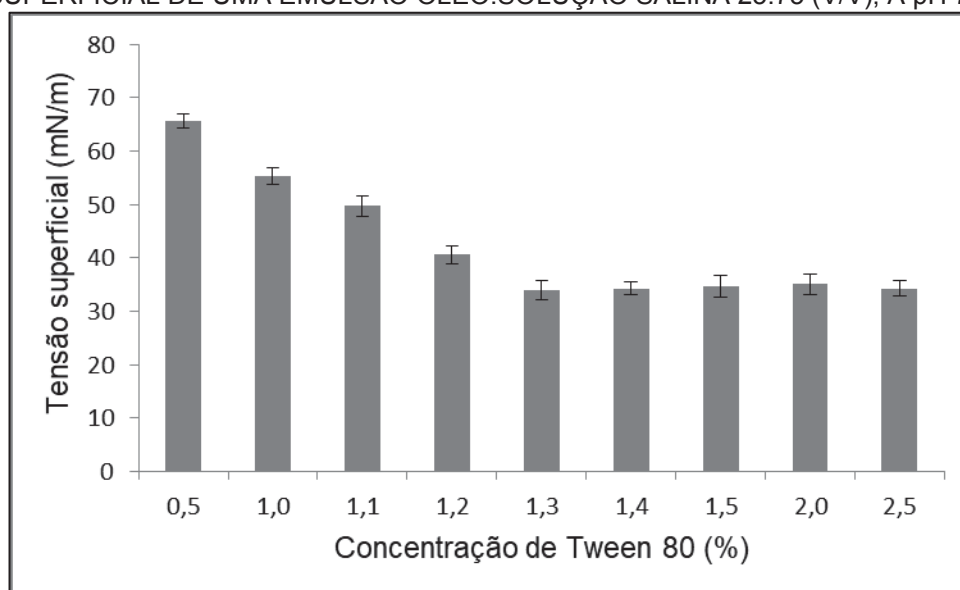
Amostra	Controle	Com pré-aquecimento
ESBR	47,48 ± 1,92 ^a	44,23 ± 0,94 ^b
ESBF	46,76 ± 1,84 ^a	42,27 ± 1,41 ^b
ESCF	43,84 ± 1,15 ^a	38,66 ± 1,31 ^b
ESBUF	44,52 ± 1,53 ^a	38,85 ± 1,49 ^b

Valores são médias ± desvio padrão.

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Avaliou-se também a tensão superficial para uma emulsão preparada apenas com Tween 80, sem a adição de proteínas do soro. Neste caso, como ilustra a Figura 33, foi observada a estabilidade a partir da concentração de 1,3% de Tween 80, onde foi atingida a tensão superficial de $33,89 \pm 1,88$ mN/m.

FIGURA 33 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE SURFATANTE TWEEN 80 NA TENSÃO SUPERFICIAL DE UMA EMULSÃO ÓLEO:SOLUÇÃO SALINA 25:75 (V/V), A pH 7,0.



Fonte: A autora (2020).

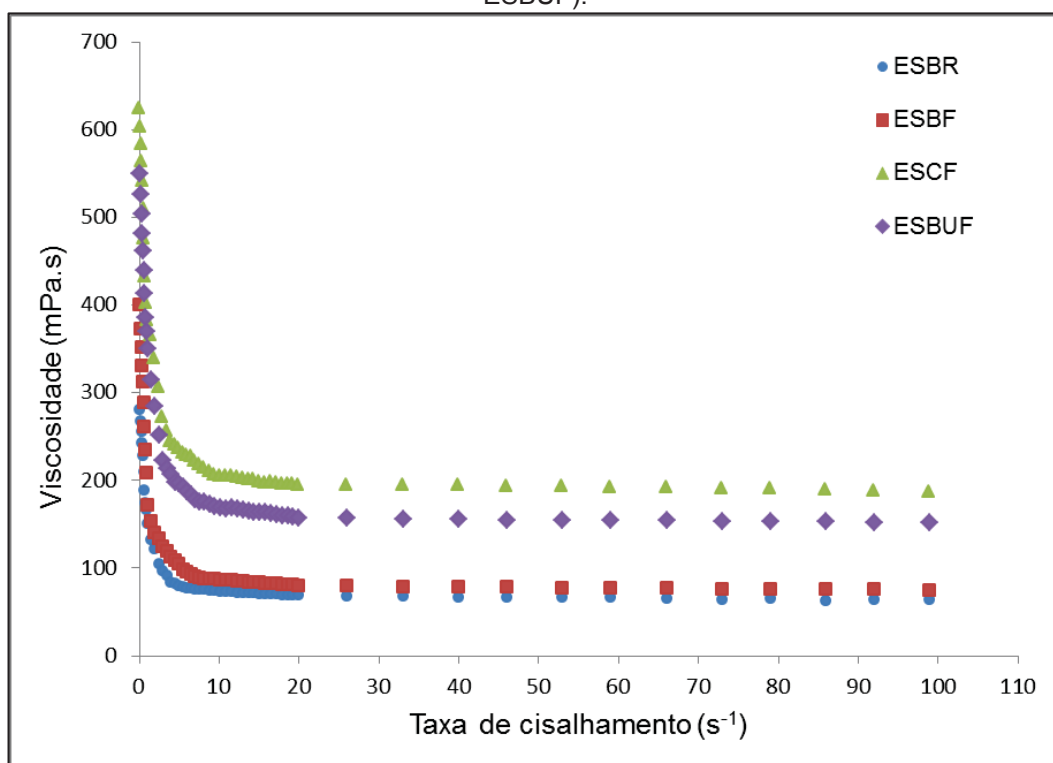
Os resultados observados para CMC do Tween 80 quando utilizado separadamente corroboram com os dados apresentados anteriormente durante a avaliação da adição dos dois surfatantes combinados. Havia sido verificado que a partir da adição de 1% de proteína e 1% de Tween 80 não existia efeito significativo sobre o IEE. Portanto, apesar de ter sido utilizada concentração inferior à CMC do surfatante sintético, a qual é de 1,3%, a adição da proteína auxiliou a estabilizar a

emulsão, diminuindo assim, mesmo que parcialmente, a quantidade necessária para promoção deste efeito.

4.3.6 Análise de viscosidade

As curvas de viscosidade obtidas para as emulsões com diferentes concentrados proteicos podem ser observadas na Figura 34. Nesta etapa do estudo, foram aplicadas soluções proteicas submetidas ao pré-aquecimento e nas concentrações identificadas como CMC.

FIGURA 34 - CURVAS DE VISCOSIDADE DAS EMULSÕES PREPARADAS A pH 7,0, PRÉ-AQUECIDAS, COM CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE 2,1% (ESBR E ESBF) E 1,7% (ESCF E ESBUF).



Fonte: A autora (2020).

A partir das curvas apresentadas, pode-se observar que a medida que se aumenta a taxa de cisalhamento há diminuição da viscosidade, para todas as amostras analisadas. Este comportamento se deve ao fato de não haver força suficiente para rompimento dos agregados moleculares em baixas taxas de cisalhamento. Conforme se aumenta a taxa de cisalhamento, as forças

hidrodinâmicas causam a separação dos agregados, provocando a diminuição da viscosidade, comportamento considerado típico de fluidos pseudoplásticos (McCLEMENTS, 1999).

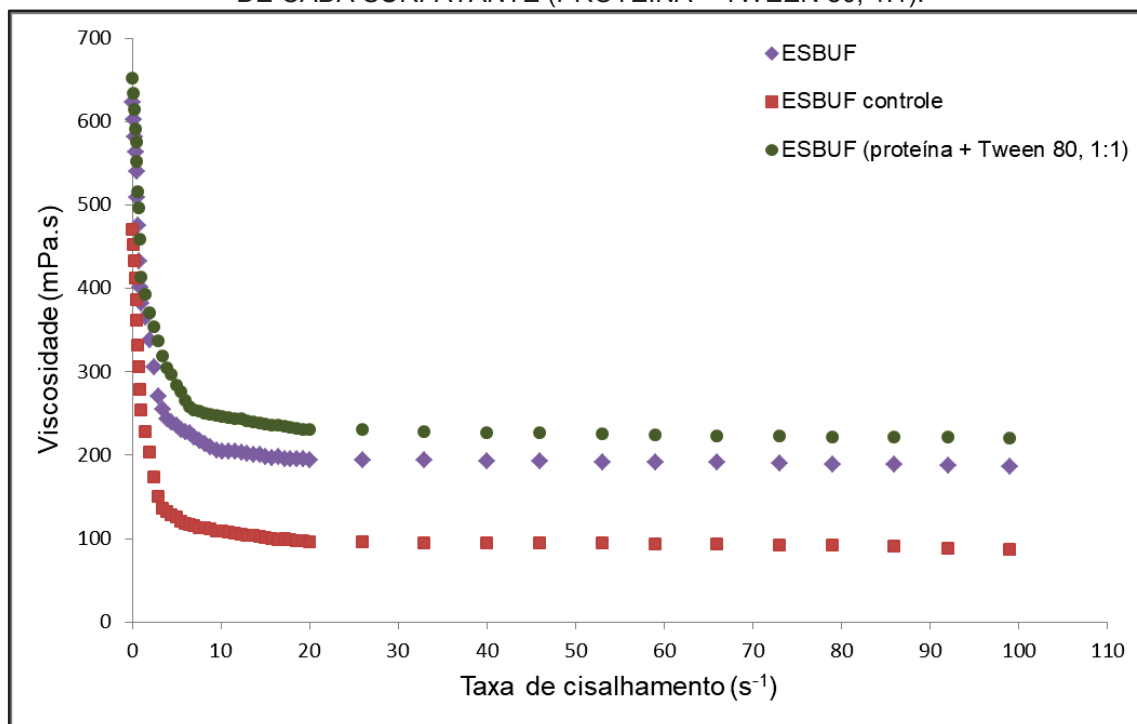
Verificou-se que aquelas emulsões mais estáveis, ESCF e ESBUF, as quais apresentam menor tamanho de gotas, bem como gotas mais uniformes, exibem também maior viscosidade, corroborando com os resultados anteriores. Para a taxa de cisalhamento de 100 s^{-1} , obteve-se viscosidade em torno de 65, 75, 185 e 150 mPa.s para as emulsões ESBR, ESBF, ESCF, ESBUF, respectivamente.

Além disso, os valores identificados para a viscosidade são semelhantes aos reportados pela literatura, no caso das emulsões com concentrados de origem bovina, que vêm sendo mais estudadas. Mohammadian et al. (2018) relataram viscosidade em torno de 50 mPa.s e Zhu et al. (2017) próximo dos 100 mPa.s, ambos para a taxa de cisalhamento igual a 100 s^{-1} , quando utilizado isolado proteico de soro bovino para o preparo de emulsões com óleo de girassol e de milho, respectivamente.

A influência do tratamento térmico pré-homogeneização sobre a viscosidade das emulsões também foi avaliado, bem como o comportamento da viscosidade ao ser utilizada a combinação de surfatantes proteína + Tween 80. Estes resultados estão apresentados na Figura 35, para a emulsão utilizando concentrado proteico de origem bubalina.

Como pode ser observado, o tratamento térmico realizado antes da homogeneização proporciona emulsões mais viscosas, efeito causado pela maior presença de gotas pequenas, as quais por sua vez são consequência da desnaturação das proteínas do soro. A viscosidade da emulsão com proteínas do soro de búfala, submetida ao pré-aquecimento, foi aproximadamente 185 mPa.s, bastante superior aos 85 mPa.s da mesma amostra na condição controle, ambas para a taxa de cisalhamento de 100 s^{-1} .

FIGURA 35 - CURVAS DE VISCOSIDADE PARA EMULSÕES COM PROTEÍNAS DO SORO DE BÚFALA A 1,7% COM E SEM PRÉ-AQUECIMENTO (ESBUF E ESBUF CONTROLE), E COM 1% DE CADA SURFATANTE (PROTEÍNA + TWEEN 80, 1:1).



Fonte: A autora (2020).

Por fim, a utilização das proteínas em combinação com o surfatante sintético também demonstrou ter efeito positivo sobre a viscosidade da emulsão. Ao empregar 1% de proteína + 1% de Tween 80, foi verificada viscosidade superior a obtida durante a utilização de apenas a proteína em concentração de 1,7%. O resultado apresentado está em consistência com os dados obtidos no subitem 4.3.4, onde a estabilidade da emulsão ao utilizar 1% de cada surfatante foi superior a utilização da proteína isolada. Além disso, estes resultados são condizentes com a CMC de cada surfatante, observada no subitem 4.3.5, que foi 1,7% para as proteínas do soro de búfala e de 1,3% para o Tween 80.

4.4 CONCLUSÃO

As amostras de concentrados proteicos apresentaram potencial como surfatante para estabilizar emulsões O/A, sendo o pH 7,0 o mais adequado, independente da origem do concentrado utilizado. De maneira geral, os

concentrados de origem caprina e bubalina demonstraram melhor desempenho na estabilidade das emulsões em comparação aos concentrados bovinos. As micrografias, bem como a distribuição do tamanho de gotas, confirmam maior população de gotas pequenas para aquelas emulsões mais estáveis, ESCF e ESBUF.

Os ensaios de aquecimento a 80 °C, durante 20 min, sugerem que a desnaturação das proteínas do soro antes da homogeneização influencia de forma positiva a estabilidade das emulsões, pois diminui a sua tensão superficial, bem como o tamanho de gotas. A viscosidade também sofre efeito positivo do pré-aquecimento, obtendo-se emulsões mais cremosas com as proteínas desnaturadas.

O aquecimento pós-homogeneização, a 90 °C, reduz o índice de estabilidade de emulsão de forma significativa para as concentrações proteicas mais baixas (0,5 e 1,0%). Para a concentração proteica de 1,5% a redução somente é significativa após 10 de aquecimento, enquanto que estabilidade da emulsão preparada com concentração de 2,0% não é afetada de forma significativa. A maior estabilidade observada nas concentrações de 1,5 e 2,0% é devido à proximidade destes valores à concentração micelar crítica, identificada como 1,7% para as soluções proteicas de cabra e búfala e 2,1% no caso de proteínas do soro bovino.

A utilização do surfatante sintético, Tween 80, demonstrou ter efeito sinérgico com as proteínas do soro na estabilização das emulsões O/A estudadas. Além disso, verificou-se que ao combinar os surfatantes, é possível utilizar menor concentração de compostos sintéticos, o que vai de encontro com o desejo atual da população por consumo de produtos mais naturais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os processamentos, separação por membranas e hidrólise enzimática, aplicados aos soros de leite de diferentes origens, permitiram um tratamento mais completo deste subproduto da indústria de laticínios, apesar das diferenças de composição observadas entre as amostras.

A ultrafiltração proporcionou a obtenção de concentrados proteicos dos soros de cabra e de búfala, além do soro bovino, que é tradicionalmente estudado e tratado por este processo. No entanto, mais estudos devem ser realizados para melhorar o fluxo de permeado, especialmente no caso dos soros não tradicionais. Os soros de cabra e de búfala apresentam maior teor de componentes como proteínas e cálcio, o que favoreceu a maior intensidade do fenômeno resistivo de *fouling*.

Para os estudos de hidrólise enzimática, a enzima imobilizada demonstrou superioridade quanto à estabilidade ao pH, temperatura e ao armazenamento, além de possibilitar sua reutilização por mais de 10 ciclos. Porém, a imobilização interfere de forma negativa na conversão da lactose em glicose e galactose, devido à menor transferência de massa conferida pelo aprisionamento da enzima. O maior teor de cálcio das amostras de soro de cabra e de búfala também possivelmente prejudicou o processo de hidrólise.

A aplicação dos processos de UF e hidrólise de forma simultânea, que trouxe o aspecto inovador para esta pesquisa, demonstrou resultados promissores, que além de contemplar o processamento dos dois principais componentes do soro, proteínas e lactose, em tempo operacional reduzido, também melhorou o desempenho da etapa de separação, pois proporcionou concentrados proteicos mais purificados do que na UF independente.

Embora as amostras de soro de leite de cabra e de búfala tenham apresentado comportamento inferior com relação ao fluxo de permeado para a UF e à conversão de lactose durante a hidrólise enzimática, os concentrados proteicos destas amostras possuem elevado potencial para promover a estabilização de emulsões O/A, inclusive, com desempenho superior aos soros de origem bovina. Além disso, todas as amostras de concentrados proteicos provaram ter sinergia com o surfatante sintético Tween 80, proporcionando melhora na estabilidade das emulsões.

Desta forma, conclui-se que apesar do amplo conhecimento sobre as propriedades do soro de leite, este ainda possui enorme potencial a ser explorado dentro da indústria de alimentos, especialmente quando originado de fontes diferentes da tradicional de origem bovina. Por fim, processos integrados que possibilitem o aproveitamento integral do soro de leite, que evitem seu descarte e subutilização, merecem maior investigação e aplicação de recursos científicos e financeiros.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Os resultados obtidos nesta tese foram publicados e submetidos a congressos e revistas científicas, como apresentado a seguir, conforme ordem cronológica.

- Apresentação do trabalho "*Influência da temperatura na separação dos componentes do soro de leite por ultrafiltração*" em formato de pôster no XIV Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, realizado em Curitiba/PR, 2017.

- Apresentação do trabalho "*Influência da pressão no processo de ultrafiltração do soro de leite*" em formato de pôster no XXVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, realizado em Belém/PA, 2018.

- Publicação do capítulo "*Influência da pressão no processo de ultrafiltração do soro de leite*" no e-book **A produção do Conhecimento nas Ciências Agrárias e Ambientais**. 1ed. Ponta Grossa/PR: Atena Editora, 2019, v. 3, p. 260-269.

- Publicação do artigo "*Membrane separation processes applied to whey: a review*" na revista **Food Reviews International**, em 06 de agosto de 2019. <https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1649694>

- Apresentação do trabalho "*Hidrólise enzimática da lactose presente no soro de leite: enzima livre e imobilizada*" em formato de pôster no XV Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, realizado em Curitiba/PR, 2019.

- Submissão do artigo "*Evaluation of concentration process of bovine, goat and buffalo cheese whey proteins by ultrafiltration*" à revista **Journal of Food Science and Technology**, em 12 de outubro de 2019 e resubmissão após correções solicitadas em 30 de janeiro de 2020.

- O artigo "*Simultaneous whey protein concentration by ultrafiltration and lactose hydrolysis using immobilized Kluyveromyces lactis β -galactosidase*" está sendo finalizado e logo será submetido à revista **Bioresource Technology**.
- O artigo "*Influence of pH, heating and surfactant addition on the properties of emulsions produced by whey protein concentrates from bovine, goat and buffalo milk*" está sendo redigido.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-SALAM, M. H.; EL-SHIBINY, S. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. **Dairy Science and Technology**, v. 91, n. 6, p. 663–699, 2011.
- ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. Disponível em: <<https://www.abiq.com.br/index.asp>>. Acesso em: 20/11/2018.
- AGHAJANI, M.; RAHIMPOUR, A.; AMANI, H.; TAHERZADEH, M. J. Rhamnolipid as new bio-agent for cleaning of ultrafiltration membrane fouled by whey. **Engineering in Life Sciences**, p. 1–9, 2018.
- AGUERO, R.; BRINGAS, E.; ROMÁN, M. F. S.; ORTIZ, I.; IBAÑEZ, R. Membrane Processes for Whey Proteins Separation and Purification. A Review. **Current Organic Chemistry**, v. 21, n. 17, p. 1740–1752, 2017.
- AKHAVAN, T.; LUHOVYY, B. L.; PANAHI, S.; et al. Mechanism of action of pre-meal consumption of whey protein on glycemic control in young adults. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 36–43, 2014.
- ALBANO, K. M.; NICOLETTI, V. R. Ultrasound impact on whey protein concentrate-pectin complexes and in the O/W emulsions with low oil soybean content stabilization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 41, p. 562–571, 2018.
- AMARAL, G. V.; SILVA, E. K.; COSTA, A. L. R.; et al. Whey-grape juice drink processed by supercritical carbon dioxide technology: Physical properties and sensory acceptance. **Lwt**, v. 92, p. 80–86, 2018.
- ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis by β galactosidase immobilized on concanavalin A-cellulose in batch and continuous mode. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 63, n. 1–2, p. 68–74, 2010.
- ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β galactosidase. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 2, p. 351–359, 2012.
- ANSARI, S.; HUSAIN, Q. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β galactosidase on concanavalin A-layered calcium alginate-cellulose beads and its application in lactose hydrolysis in continuous spiral bed reactors. **Polish Journal of Chemical Technology**, v. 13, n. 4, p. 15–20, 2011.
- ANTHONY, J. C.; ANTHONY, T. G.; KIMBALL, S. R.; JEFFERSON, L. S. Signaling Pathways Involved in Translational Control of Protein Synthesis in Skeletal Muscle by Leucine 1. **The Journal of nutrition**, p. 856–860, 2001.
- ANTUNES, A. J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. São Paulo: Manole, 2003.
- AOAC. Official Methods of Analysis. **Official Methods of Analysis of AOAC international**, v. 18th editi, n. February, p. 20877–2417, 2005.
- APHA. STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND

WASTE-WATER (12th ed.). **American Journal of Public Health and the Nations Health**, 2005. Washington DC.

AQUINO, L. F. M. C.; DE MOURA BELL, J. M. L. N.; COHEN, J. L.; et al. Purification of caprine oligosaccharides at pilot-scale. **Journal of Food Engineering**, v. 214, p. 226–235, 2017.

ARAÚJO, J. M. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 5^a ed. Viçosa-MG: UFV, 2011.

AREFI-OSKOUI, S.; VATANPOUR, V.; KHATAEE, A. Development of a novel high-flux PVDF-based ultrafiltration membrane by embedding Mg-Al nanolayered double hydroxide. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 41, p. 23–32, 2016.

ARUNKUMAR, A.; MOLITOR, M. S.; ETZEL, M. R. Comparison of flat-sheet and spiral-wound negatively-charged wide-pore ultrafiltration membranes for whey protein concentration. **International Dairy Journal**, v. 56, p. 129–133, 2016.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2^a ed. New York: McGraw-Hill, 1986.

BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. , v. 278, p. 381–386, 2011.

BARROS, B. N.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995.

BARROS, S. T. D.; ANDRADE, C. M. G.; MENDES, E. S.; PERES, L. Study of fouling mechanism in pineapple juice clarification by ultrafiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 215, n. 1–2, p. 213–224, 2003.

BARUKČIĆ, I.; BOŽANIĆ, R.; KULOZIK, U. Influence of process temperature and microfiltration pre-treatment on flux and fouling intensity during cross-flow ultrafiltration of sweet whey using ceramic membranes. **International Dairy Journal**, v. 51, p. 1–7, 2015.

BASSETTO, R. Z.; CABRAL, P. S.; SILVEIRA, M. H. L.; ALMEIDA, M. M.; CHIQUELLO, N. C. Optimization of β -galactosidase production from *Penicillium* sp. for synthesis of galactooligosaccharides. **International Food Research Journal**, v. 24, n. 4, p. 1793–1798, 2017.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia de Leite: leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações - Produção, Industrialização e Análise**. 14^a ed. São Paulo: Nobel, 1984.

BEHRING, J. L.; LUCAS, M.; MACHADO, C.; BARCELLOS, I. O. Adaptação no método do peso da gota para determinação da tensão superficial: Um método simplificado para a quantificação da CMC de surfactantes no ensino da química. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 492–495, 2004.

BENIWAL, A.; SAINI, P.; KOKKILIGADDA, A.; VIJ, S. Use of silicon dioxide nanoparticles for β -galactosidase immobilization and modulated ethanol production by co-immobilized *K. marxianus* and *S. cerevisiae* in deproteinized cheese whey.

LWT - Food Science and Technology, v. 87, p. 553–561, 2018.

BERG, T. H. A.; KNUDSEN, J. C.; IPSEN, R.; et al. Investigation of consecutive fouling and cleaning cycles of ultrafiltration membranes used for whey processing. **International Journal of Food Engineering**, v. 10, n. 3, p. 367–381, 2014.

BERG, T.; IPSEN, R.; OTTOSEN, N.; TOLKACH, A.; VAN DEN BERG, F. Influence of Reduced Cleaning-In-Place on Aged Membranes during Ultrafiltration of Whey. **International Journal of Food Engineering**, v. 11, n. 4, p. 447–455, 2015.

BOSSO, A.; MORIOKA, L. R. I.; SANTOS, L. F. DOS; SUGUIMOTO, H. H. Lactose hydrolysis potential and thermal stability of commercial β -galactosidase in UHT and skimmed milk. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 159–165, 2016.

BOUYER, E.; MEKHLOUFI, G.; ROSILIO, V.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1–2, p. 359–378, 2012.

BOX, G. E. P.; WETZ, J. **Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function**. University of Wisconsin Technical Report, 1973.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. **Food Research International**, v. 73, p. 149–161, 2015.

BRANS, G.; SCHROËN, C. G. P. H.; VAN DER SMAN, R. G. M.; BOOM, R. M. Membrane fractionation of milk: State of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, v. 243, n. 1–2, p. 263–272, 2004.

BRANS; SCHROEN; SMAN; BOOM, R. M. Membrane fractionation of milk : state of the art and challenges. , v. 243, p. 263–272, 2004.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS/MS). Portaria nº 540**. 1997.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Projeto de Instrução Normativa que estabelece os Padrões de Identidade e Qualidade do soro de leite**. 2012.

BUCHHOLZ, K.; KLEIN, J. Characterization of immobilized biocatalysts. **Academic**, v. 135, p. 3–30, 1987.

BYLUND, G. Dairy processing handbook. **Tetra Pak Processing AB, Lund**, 2003.

ÇAKIR-FULLER, E. Enhanced heat stability of high protein emulsion systems provided by microparticulated whey proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 41–50, 2015.

CAPPATO, L. P.; FERREIRA, M. V. S.; MORAES, J.; et al. Whey acerola-flavoured drink submitted Ohmic Heating: Bioactive compounds, antioxidant capacity, thermal behavior, water mobility, fatty acid profile and volatile compounds. **Food Chemistry**, v. 263, p. 81–88, 2018.

CARDOSO, B. B.; SILVÉRIO, S. C.; ABRUNHOSA, L.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. β -galactosidase from *Aspergillus lacticoffeatus*: A promising biocatalyst for the synthesis of novel prebiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 257, p. 67–74, 2017.

CATTANEO, T. M. P.; MARINONI, L.; IAMETTI, S.; MONTI, L. Behavior of Aflatoxin M1 in dairy wastes subjected to different technological treatments: Ricotta cheese production, ultrafiltration and spray-drying. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 77–82, 2013.

CHAMBERLAND, J.; BEAULIEU-CARBONNEAU, G.; LESSARD, M. H.; et al. Effect of membrane material chemistry and properties on biofouling susceptibility during milk and cheese whey ultrafiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 542, n. July, p. 208–216, 2017.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and Microfiltration Handbook**. 1998.

CHEUNG, L. K. Y.; ALUKO, R. E.; CLIFF, M. A.; LI-CHAN, E. C. Y. Effects of exopeptidase treatment on antihypertensive activity and taste attributes of enzymatic whey protein hydrolysates. **Journal of Functional Foods**, v. 13, p. 262–275, 2015.

CHEVALLIER, M.; RIAUBLANC, A.; LOPEZ, C.; et al. Aggregated whey proteins and trace of caseins synergistically improve the heat stability of whey protein-rich emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 487–495, 2016.

CHEVALLIER, M.; RIAUBLANC, A.; LOPEZ, C.; et al. Increasing the heat stability of whey protein-rich emulsions by combining the functional role of WPM and caseins. **Food Hydrocolloids**, v. 76, p. 164–172, 2018.

CHOLLANGI, A.; HOSSAIN, M. M. Separation of proteins and lactose from dairy wastewater. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 46, n. 5, p. 398–404, 2007.

CONWAY, V.; GAUTHIER, S. F.; POULIOT, Y. Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins, and their enzymatic hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 2, p. 364–372, 2013.

CORBATÓN-BÁGUENA, M.; ÁLVAREZ-BLANCO, S.; VINCENT-VELA, M. C. Fouling mechanisms of ultrafiltration membranes fouled with whey model solutions. **Desalination**, v. 360, p. 87–96, 2015.

CORROCHANO, A. R.; BUCKIN, V.; KELLY, P. M.; GIBLIN, L. Invited review: Whey proteins as antioxidants and promoters of cellular antioxidant pathways. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 6, p. 4747–4761, 2018.

COWAN, S.; RITCHIE, S. Modified polyethersulfone (PES) ultrafiltration membranes for enhanced filtration of whey proteins. **Separation Science and Technology**, v. 42, n. 11, p. 2405–2418, 2007.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2011.

DAS, B.; BHATTACHARJEE, S.; BHATTACHARJEE, C. Recovery of Whey Proteins and Enzymatic Hydrolysis of Lactose Derived from Casein Whey Using a Tangential Flow Ultrafiltration Module. **Journal of The Institution of Engineers (India): Series**

E, v. 94, n. 2, p. 79–84, 2013.

DAS, B.; ROY, A. P.; BHATTACHARJEE, S.; CHAKRABORTY, S.; BHATTACHARJEE, C. Lactose hydrolysis by β -galactosidase enzyme: Optimization using response surface methodology. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 121, p. 244–252, 2015.

DAS, B.; SARKAR, S.; SARKAR, A.; BHATTACHARJEE, S.; BHATTACHARJEE, C. Recovery of whey proteins and lactose from dairy waste: A step towards green waste management. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 101, p. 27–33, 2016.

DEMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Fennema's food chemistry**. 4^a ed. Boca Raton: CRC, 2010.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 1, p. 25–39, 2003.

DOMINGUES, L.; DANTAS, M. M.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. Continuous ethanol fermentation of lactose by a recombinant flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, n. 6, p. 692–697, 1999.

EDWARDS, P. B. Structure and stability of whey proteins. **Milk proteins: from expression to food**. p.535, 2009. New York: Elsevier.

EFFENDY, I.; MAIBACH, H. I. Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. **Contact Dermatitis**, v. 33, p. 217–225, 1995.

EUROSTAT. Statistical article: Milk and milk product statistics. Disponível em: <https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Milk_and_milk_product_statistics#Milk_products>. Acesso em: 20/5/2019.

FAO. Dairy Market Review. Disponível em: <<http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/dairy/milk-and-milk-products/en>>. Acesso em: 15/5/2019.

FELIPE, L. D. O.; DIAS, S. D. C. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 3, p. 228–236, 2017.

FERNANDEZ-ARROJO, L.; RODRIGUEZ-COLINAS, B.; GUTIERREZ-ALONSO, P.; et al. Dried alginate-entrapped enzymes (DALGEEs) and their application to the production of fructooligosaccharides. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 4, p. 677–682, 2013.

FIELD, R. W.; WU, D.; HOWELL, J. A.; GUPTA, B. B. Critical flux concept for microfiltration fouling. **Journal of Membrane Science**, v. 100, p. 259–272, 1995.

FISCHER, J. **Hidrólise de Lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* Imobilizada em Reator de Leito Fixo**, 2010. UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

FRIBERG, S. E.; LARSSON, K.; SJÖBLOM, J. **Food Emulsions**. Fourth Edition. New York: Marcel Dekker, 2004.

GAJO, A. A.; DE RESENDE, J. V.; COSTA, F. F.; et al. Effect of hydrocolloids blends on frozen dessert “popsicles” made with whey concentrated. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 473–480, 2017.

GALANAKIS, C. M.; CHASIOTIS, S.; BOTSARIS, G.; GEKAS, V. Separation and recovery of proteins and sugars from Halloumi cheese whey. **Food Research International**, v. 65, p. 477–483, 2014.

GANJU, S.; GOGATE, P. R. A review on approaches for efficient recovery of whey proteins from dairy industry effluents. **Journal of Food Engineering**, v. 215, p. 84–96, 2017.

GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hidrolysis of Lactose: A Literature Review. **Process Biochemistry**, v. 20, p. 2–12, 1985.

GHARSALLAOUI, A.; SAUREL, R.; CHAMBIN, O.; et al. Utilisation of pectin coating to enhance spray-dry stability of pea protein-stabilized oil-in-water emulsions. **Food Chem.**, v. 122, p. 447–454, 2010.

GHOSH, B. C.; PRASAD, L. N.; SAHA, N. P. Enzymatic hydrolysis of whey and its analysis. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 6, p. 1476–1483, 2017.

GILLIES, M. T. Whey Processing and Utilization. **Food Technology Review**, v. 19, p. 211, 1974.

GOMES, A.; COSTA, A. L. R.; CUNHA, R. L. Impact of oil type and WPI/Tween 80 ratio at the oil-water interface: Adsorption, interfacial rheology and emulsion features. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 164, p. 272–280, 2018.

GOMES, T. A. **β -Galactosidase de Origem Microbiana: Produção, Otimização, Escalonamento e Caracterização**, 2018. Universidade Federal do Paraná.

GÓMEZ, L.; RAMIREZ, H. L.; VILLALONGA, M. L.; HERNÁNDEZ, J.; VILLALONGA, R. Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 22–27, 2005.

GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by “HLB”. **Journal of the Society of cosmetic chemists**, v. 1, p. 311–326, 1949.

GUGGISBERG, D.; CHOLLET, M.; SCHREIER, K.; PORTMANN, R.; EGGER, L. Effects of heat treatment of cream on the physical-chemical properties of model oil-in-buttermilk emulsions. **International Dairy Journal**, v. 26, n. 1, p. 88–93, 2012. Elsevier Ltd.

GUISAN, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. Springer, 2013.

GUZEY, D.; MCCLEMENTS, D. . Influence of environmental stresses on O/W emulsions stabilized by β -lactoglobulin-pectin and β -lactoglobulin pectin-chitosan membranes produced by the electrostatic layer-by-layer deposition technique. **Food Biophys**, v. 1, p. 30–40, 2006.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Effects of hydrocolloids and processing conditions on

acid whey production with reference to Greek yogurt. **Trends in Food Science and Technology**, v. 56, p. 61–76, 2016.

HA, E.; ZEMEL, M. B. Functional properties of whey , whey components , and essential amino acids : mechanisms underlying health benefits for active people (Review). , v. 14, p. 251–258, 2003.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de Separação por Membranas**. 3^o ed. Escola piloto em engenharia química, Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2006.

HAIDER, T.; HUSAIN, Q. Hydrolysis of milk/whey lactose by β -galactosidase: A comparative study of stirred batch process and packed bed reactor prepared with calcium alginate entrapped enzyme. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, n. 1, p. 576–580, 2009.

HENRY, J. V. L.; FRYER, P. J.; FRITH, W. J.; NORTON, I. T. Emulsification mechanism and storage instabilities of hydrocarbon-in-water sub-micron emulsions stabilised with Tweens (20 and 80), Brij 96v and sucrose monoesters. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 338, n. 1, p. 201–206, 2009.

HÉRMIA, J. Constant pressure blocking filtration laws. Applications to power—law non-Newtonian fluids. **Trans. Ichem. E.**, v. 60, p. 183–187, 1982.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RAMOS, M.; GÓMEZ-RUIZ, J. Á. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. **Small Ruminant Research**, v. 101, n. 1–3, p. 196–204, 2011.

HO, C. C.; ZYDNEY, A. L. A combined pore blockage and cake filtration model for protein fouling during microfiltration. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 232, n. 2, p. 389–399, 2000.

HOCHWALLNER, H.; SCHULMEISTER, U.; SWOBODA, I.; SPITZAUER, S.; VALENTA, R. Cow's milk allergy: From allergens to new forms of diagnosis, therapy and prevention. **Methods**, v. 66, n. 1, p. 22–33, 2014.

HOFFMAN, J. R.; FALVO, M. J. Protein - Which is best? **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 3, n. 3, p. 118–130, 2004.

HUSAIN, Q.; ANSARI, S. A.; ALAM, F.; AZAM, A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 1, p. 37–43, 2011.

IBRAHIM, H. R.; AHMED, A. S.; MIYATA, T. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. **Journal of Advanced Research**, v. 8, n. 1, p. 63–71, 2017. Cairo University.

ILTCHENCO, S.; PRECI, D.; BONIFACINO, C.; FRANCO, E.; STEFFENS, C. Whey protein concentration by ultrafiltration and study of functional properties. **Ciência Rural**, v. 48, n. 5, p. 1–11, 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físicos-químicos para análise de Alimentos**. 4^a ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz ©, 2008.

JANG, H. D.; SWAISGOOD, H. E. Disulfide bond formation between thermally denatured b-lactoglobulin and k-casein in casein micelles. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 900–904, 1990.

JAYAMUTHUNAGAI, J.; SRISOWMEYA, G.; CHAKRAVARTHY, M.; GAUTAM, P. D-Tagatose production by permeabilized and immobilized *Lactobacillus plantarum* using whey permeate. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 250–255, 2017.

JIANG, S.; ALTAF HUSSAIN, M.; CHENG, J.; et al. Effect of heat treatment on physicochemical and emulsifying properties of polymerized whey protein concentrate and polymerized whey protein isolate. **Lwt**, v. 98, p. 134–140, 2018.

JIN, Y.; PARASHAR, A.; MASON, B.; BRESSLER, D. C. Simultaneous hydrolysis and co-fermentation of whey lactose with wheat for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 616–624, 2016.

JURADO, E.; BRAVO, V.; CAMACHO, F.; VICARIA, J. M.; FERNÁNDEZ-ARTEAGA, A. Estimation of the distribution of droplet size, interfacial area and volume in emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 295, n. 1–3, p. 91–98, 2007.

KHAN, A.; ALZOHAIY, A. Recent advances and applications of immobilized enzyme technologies: a review. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 8, p. 565–575, 2010.

KINSELLA, J. E.; WHITEHEAD, D. M. Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 33, p. 343–438, 1989.

KLEIN, M.; ASERIN, A.; SVITOV, I.; GARTI, N. Enhanced stabilization of cloudy emulsions with gum Arabic and whey protein isolate. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 77, n. 1, p. 75–81, 2010.

KLEIN, M. P.; FALLAVENA, L. P.; SCHÖFFER, J. D. N.; et al. High stability of immobilized β -d-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 465–470, 2013.

KOKKILIGADDA, A.; BENIWAL, A.; SAINI, P.; VIJ, S. Utilization of Cheese Whey Using Synergistic Immobilization of β -Galactosidase and *Saccharomyces cerevisiae* Cells in Dual Matrices. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n. 8, p. 1469–1484, 2016.

KONRAD, G.; KLEINSCHMIDT, T.; FABER, W. Ultrafiltration flux of acid whey obtained by lactic acid fermentation. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 1, p. 73–77, 2012.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 2, p. 177–187, 2009.

KRISSANSEN, G. W. Emerging Health Properties of Whey Proteins and Their. , v. 26, n. 6, p. 713–723, 2007.

KUMAR, B. V.; VIJAYENDRA, S. V. N.; REDDY, O. V. S. Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. **Journal of Food Science and Technology**, v.

52, n. 10, p. 6112–6124, 2015.

LEAL-CALDERON, F.; SCHMITT, V.; BIBETTE, J. **Emulsion Science: Basics Principles**. 2^a ed. New York: Springer, 2007.

LECH, M.; NIESOBSKA, A.; TRUSEK-HOLOWNIA, A. Dairy wastewater utilization: separation of whey proteins in membrane and chromatographic processes. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 48–49, p. 23326–23334, 2016.

LEMARCHAND, C.; COUVREUR, P.; VAUTHIER, C.; COSTANTINI, D.; GREF, R. Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan. **Int. J. Pharma**, v. 254, p. 77–82, 2003.

LEVIN, M. A.; BURRINGTON, K. J.; HARTEL, R. W. Whey protein phospholipid concentrate and delactosed permeate: Applications in caramel, ice cream, and cake. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 9, p. 6948–6960, 2016.

LI, Y.; HU, M.; XIAO, H.; et al. Controlling the functional performance of emulsion-based delivery systems using multicomponent biopolymer coatings. **Eur. J. Pharma. Biopharma**, v. 76, p. 38–47, 2010.

LIANG, Y.; MATIA-MERINO, L.; GILLIES, G.; et al. The heat stability of milk protein-stabilized oil-in-water emulsions: A review. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 28, p. 63–73, 2017.

LIANG, Y.; PATEL, H.; MATIA-MERINO, L.; YE, A.; GOLDING, M. Effect of pre- and post-heat treatments on the physicochemical, microstructural and rheological properties of milk protein concentrate-stabilised oil-in-water emulsions. **International Dairy Journal**, v. 32, n. 2, p. 184–191, 2013.

LIU, D. M.; CHEN, J.; SHI, Y. P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 332–342, 2018.

LIU, Y.; CHEN, Z.; JIANG, Z.; YAN, Q.; YANG, S. Biochemical characterization of a novel β -galactosidase from *Paenibacillus barengoltzii* suitable for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1055–1063, 2017.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the folin phenol reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

LU, W.; ZHENG, B.; MIAO, S. Improved emulsion stability and modified nutrient release by structuring O/W emulsions using konjac glucomannan. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 120–128, 2018.

LUCAS, A.; ROCK, E.; CHAMBA, J. F.; et al. Respective effects of milk composition and the cheese-making process on cheese compositional variability in components of nutritional interest. **Lait**, v. 86, n. 1, p. 21–41, 2006.

LUJÁN-FACUNDO, M.-J.; MENDOZA-ROCA, J.-A.; CUARTAS-URIBE, B.; ÁLVAREZ-BLANCO, S. Membrane fouling in whey processing and subsequent cleaning with ultrasounds for a more sustainable process. **Journal of Cleaner**

Production, v. 143, p. 804–813, 2017.

MACEDO, A.; DUARTE, E.; FRAGOSO, R. Assessment of the performance of three ultrafiltration membranes for fractionation of ovine second cheese whey. **International Dairy Journal**, v. 48, p. 31–37, 2015.

MACEDO, A.; DUARTE, E.; PINHO, M. The role of concentration polarization in ultrafiltration of ovine cheese whey. **Journal of Membrane Science**, v. 381, n. 1–2, p. 34–40, 2011.

MADUREIRA, A. R.; PEREIRA, C. I.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. **Food Research International**, v. 40, p. 1197–1211, 2007.

MANTI, S.; LOUGARIS, V.; CUPPARI, C.; et al. Breastfeeding and IL-10 levels in children affected by cow's milk protein allergy: A retrospective study. **Immunobiology**, v. 222, n. 2, p. 358–362, 2017.

MARTINS, C. P. C.; FERREIRA, M. V. S.; ESMERINO, E. A.; et al. Chemical, sensory, and functional properties of whey-based popsicles manufactured with watermelon juice concentrated at different temperatures. **Food Chemistry**, v. 255, p. 58–66, 2018.

MARX, M.; KULOZIK, U. Spore inactivation in differently composed whey concentrates. **International Dairy Journal**, v. 76, p. 1–9, 2018.

MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. **Functional Dairy Products**. Englang: Woodhead, 2003.

MCCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques**. New York: CRC Press, 1999.

MCCLEMENTS, D. J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 7, p. 611–649, 2007.

MCCLEMENTS, D. J.; COUPLAND, J. N. Theory of droplet size distribution measurements in emulsions using ultrasonic spectroscopy. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 117, p. 161–170, 1996.

MEDHAMMAR, E.; WIJESINHA-BETTONI, R.; STADLMAYR, B.; et al. Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: A biodiversity perspective. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 3, p. 445–474, 2012.

MENGUAL, O.; MEUNIER, G.; CAYRE, I.; PUECH, K.; SNABRE, P. TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurements for concentrated emulsion and suspension instability analysis. **Talanta**, v. 50, p. 445–456, 1999.

MILLER, G. D.; JARVIS, J. K.; MCBEAN, L. D. **Handbook of Dairy Foods and Nutrition**. Rosemont, Illinois: National Dairy Council®, 2002.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MLICHOVÁ, Z.; ROSENBERG, M. Current trends of β -galactosidase application in food technology. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 45, n. 2, p. 47–54, 2006.

MOHAMMADIAN, M.; SALAMI, M.; EMAM-DJOMEH, Z.; MOMEN, S.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Gelation of oil-in-water emulsions stabilized by heat-denatured and nanofibrillated whey proteins through ion bridging or citric acid-mediated cross-linking. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2247–2258, 2018.

MOLLEA, C.; MARMO, L.; BOSCO, F. Valorisation of Cheese Whey, a By-Product from the Dairy Industry. **Food Industry**, , n. 24, p. 1–40, 2013.

MONTEIRO, S. H. M. C.; SILVA, E. K.; ALVARENGA, V. O.; et al. Effects of ultrasound energy density on the non-thermal pasteurization of chocolate milk beverage. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 42, p. 1–10, 2018.

MORRISON, I. D.; ROSS, S. **Colloidal dispersions: suspensions, emulsions, and foams**. New York: Wiley, 2002.

MÖRSCHBÄCHER, A. P.; VOLPATO, G.; SOUZA, C. F. V. DE. Kluyveromyces lactis β -galactosidase immobilization in calcium alginate spheres and gelatin for hydrolysis of cheese whey lactose. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 921–926, 2016.

MOURA BELL, J. M. L. N.; AQUINO, L. F. M. C.; LIU, Y.; et al. Modeling lactose hydrolysis for efficiency and selectivity: Toward the preservation of sialyloligosaccharides in bovine colostrum whey permeate. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 8, p. 6157–63, 2016.

MOURA BELL, J. M. L. N.; COHEN, J. L.; DE AQUINO, L. F. M. C.; et al. An integrated bioprocess to recover bovine milk oligosaccharides from colostrum whey permeate. **Journal of Food Engineering**, v. 216, p. 27–35, 2017.

MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**. 2^a ed. Springer B.V., 1996.

NATH, A.; CHAKRABORTY, S.; BHATTACHARJEE, C.; CHOWDHURY, R. Studies on the separation of proteins and lactose from casein whey by cross-flow ultrafiltration. **Desalination and Water Treatment**, v. 54, n. 2, p. 481–501, 2014.

NAWAZ, M. A.; REHMAN, H. U.; BIBI, Z.; AMAN, A.; UL QADER, S. A. Continuous degradation of maltose by enzyme entrapment technology using calcium alginate beads as a matrix. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 4, p. 250–256, 2015.

NG, K. S. Y.; HARIBABU, M.; HARVIE, D. J. E.; DUNSTAN, D. E.; MARTIN, G. J. O. Mechanisms of flux decline in skim milk ultrafiltration: A review. **Journal of Membrane Science journal**, v. 523, p. 144–162, 2017.

NGUYEN, H. H.; KIM, M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. **Appl. Sci. Conver. Technol**, v. 26, n. 6, p. 157–163, 2017.

NGUYEN, T.; SPLECHTNA, B.; STEINBO, M.; et al. Purification and Characterization of Two Novel β -galactosidase from Lactobacillus reuteri. **J.Agric.FoodChem**, v. 54, p. 4989–4998, 2006.

NI, X.; ZANG, Y.; MUSTAFA, I. An investigation of droplet size and size distribution in methylmethacrylate suspensions in a batch oscillatory-baffled reactor. **Chemical Engineering Science**, v. 53, p. 2903–2919, 1998.

NISHANTHI, M.; CHANDRAPALA, J.; VASILJEVIC, T. Impact of storage conditions on solubility, heat stability and emulsifying properties of selected spray dried whey protein concentrates. **LWT - Food Science and Technology**, v. 92, p. 16–21, 2018.

NISHANTHI, M.; VASILJEVIC, T.; CHANDRAPALA, J. Properties of whey proteins obtained from different whey streams. **International Dairy Journal**, v. 66, p. 76–83, 2017.

NOGUEIRA, A. DE C.; STEEL, C. J. Protein enrichment of biscuits: a review. **Food Reviews International**, v. 34, n. 8, p. 796–809, 2018.

NORAZMAN, N.; WU, W.; LI, H.; et al. Evaluation of chemical cleaning of UF membranes fouled with whey protein isolates via analysis of residual protein components on membranes surface. **Separation and Purification Technology**, v. 103, p. 241–250, 2013.

O'KEEFFE, M. B.; CONESA, C.; FITZGERALD, R. J. Identification of angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant peptides in a whey protein concentrate hydrolysate produced at semi-pilot scale. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 1751–1759, 2017.

OBÓN, J. M.; CASTELLAR, M. R.; IBORRA, J. L.; MANJÓN, A. Beta-galactosidase immobilization for milk lactose hydrolysis: A simple experimental and modeling study of batch and continuous reactors. **Biochemical Education**, v. 28, n. 3, p. 164–168, 2000.

ONWULATA, C. I.; HUTH, P. J. **Whey Processing, Functionality and Health Benefits**. 1^a ed. Blackwell Publishing and Institute of Food Technologists, 2008.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnología de Alimentos. Volume 2: Alimentos de Origen Animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

OWENS, C.; GRIFFIN, K.; KHOURYIEH, H.; WILLIAMS, K. Creaming and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized by whey protein-xanthan-locust bean complexes: Impact of pH. **Food Chemistry**, v. 239, p. 314–322, 2018.

PARODI, P. W. A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention. **Current Pharmaceutical Design**, v. 3, n. 8, p. 813–828, 2007.

PATEL, A. K.; VAISNAV, N.; MATHUR, A.; GUPTA, R.; TULI, D. K. Whey waste as potential feedstock for biohydrogen production. **Renewable Energy**, v. 98, p. 221–225, 2016.

PATEL, S. Functional food relevance of whey protein: A review of recent findings and scopes ahead. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 308–319, 2015.

PATIL, N. V.; JANSSEN, A. E. M.; BOOM, R. M. Separation of Whey Proteins using Cascaded Ultrafiltration. **Separation Science and Technology**, v. 49, n. 15, p. 2280–2288, 2014.

- PEARCE, K. N.; KINSELLA, J. E. Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 716–723, 1978.
- PEINEMANN, K.; NUNES, S. P.; GIORNO, L. **Membrane Technology. Volume 3: Membranes for Food Applications**. Weinheim-Alemanha: Wiley-VCH, 2010.
- POPESCU, A. Study Regarding the Trends in the World and European Goat Milk Production. **Lucrări Științifice-Seria Zootehnie**, v. 59, p. 127–132, 2013.
- PRASHANTH, S. J.; MULIMANI, V. H. Soymilk oligosaccharide hydrolysis by *Aspergillus oryzae* α -galactosidase immobilized in calcium alginate. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3–4, p. 1199–1205, 2005.
- RAIKOS, V. Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 4, p. 259–265, 2010.
- RALPH, W. Profits in whey. **Rural Research**, v. 116, p. 22–27, 1982.
- RATHOUR, A. K.; RATHORE, V.; MEHTA, B. M.; et al. Standardization and Storage Study of Whey Protein Concentrate (WPC-70) Prepared from Buffalo Milk Using Ultrafiltration Membrane Technology. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, n. 3, p. 1–8, 2017.
- REGENHARDT, S. A.; MAMMARELLA, E. J.; RUBIOLO, A. C. Hydrolysis of lactose from cheese whey using a reactor with β -galactosidase enzyme immobilised on a commercial uf membrane. **Chemical and Process Engineering - Inżynieria Chemiczna i Procesowa**, v. 34, n. 3, p. 375–385, 2013.
- RENNER, E.; ABD EL-SALAM, M. H. **Ultrafiltration of whey. Application of Ultrafiltration in Dairy Industry**. New York: Elsevier Science, 1991.
- REZAEI, H.; ASHTIANI, F. Z.; FOULADITAJAR, A. Effects of operating parameters on fouling mechanism and membrane flux in cross-flow microfiltration of whey. **DES**, v. 274, n. 1–3, p. 262–271, 2011.
- RIEMSDIJK, L. E. V.; VAN DER GOOT, A. J.; HAMER, R. J. The use of whey protein particles in gluten-free bread production, the effect of particle stability. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 7, p. 1744–1750, 2011.
- RYAN, M. P.; WALSH, G. The biotechnological potential of whey. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 479–498, 2016.
- SABOKBAR, N.; KHODAIYAN, F. Total phenolic content and antioxidant activities of pomegranate juice and whey based novel beverage fermented by kefir grains. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 739–747, 2016.
- SAHAGÚN, M.; BRAVO-NÚÑEZ, Á.; BÁSCONES, G.; GÓMEZ, M. Influence of protein source on the characteristics of gluten-free layer cakes. **Lwt**, v. 94, p. 50–56, 2018.
- ŞAHİN, F.; DEMIREL, G.; TÜMTÜRK, H. A novel matrix for the immobilization of acetylcholinesterase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 37, n. 3, p. 148–153, 2005.

SALAMI, M.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; EHSANI, M. R.; et al. Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3297–3302, 2010.

SANMARTÍN, B.; DÍAZ, O.; RODRÍGUEZ-TURIENZO, L.; COBOS, A. Functional properties of caprine whey protein concentrates obtained from clarified cheese whey. **Small Ruminant Research**, v. 110, n. 1, p. 52–56, 2013.

SANTOS, A. P.; PANAGIOTOPOULOS, A. Z. Determination of the critical micelle concentration in simulations of surfactant systems. **Journal of Chemical Physics**, v. 144, n. 4, 2016.

SCHONG, E.; FAMELART, M. H. Dry heating of whey proteins. **Food Research International**, v. 100, p. 31–44, 2017.

SCHRAMM, L. L. **Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and applications**. Weinheim-Alemanha, 2005.

SCHRÖDER, A.; BERTON-CARABIN, C.; VENEMA, P.; CORNACCHIA, L. Interfacial properties of whey protein and whey protein hydrolysates and their influence on O/W emulsion stability. **Food Hydrocolloids**, v. 73, p. 129–140, 2017.

SEADER, J. D.; HENLEY, E. J. **Separation process principles**. Second Edi ed. Danvers, MA: John Wiley & Sons, Inc., 2006.

SEIFU, E.; BUYS, E. M.; DONKIN, E. F. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 4, p. 137–154, 2005.

SHAKERIAN, M.; KIANI, H.; EHSANI, M. R. Effect of buffalo milk on the yield and composition of buffalo feta cheese at various processing parameters. **Food Bioscience**, v. 15, p. 110–117, 2016.

SHI, J.; AHLROOS-LEHMUS, A.; PILVI, T. K.; et al. Metabolic effects of a novel microfiltered native whey protein in diet-induced obese mice. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 2, p. 440–449, 2012.

SHI, J.; FINCKENBERG, P.; MARTONEN, E.; et al. Metabolic effects of lactoferrin during energy restriction and weight regain in diet-induced obese mice. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 1, p. 66–78, 2012.

SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. , v. 57, p. 1–11, 1996.

SMITHERS, G. W. Whey and whey proteins-From “gutter-to-gold”. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 695–704, 2008.

SMITHERS, G. W. Whey-ing up the options - Yesterday, today and tomorrow. **International Dairy Journal**, v. 48, p. 2–14, 2015.

SRIPRABLOM, J.; LUANGPITUKSA, P.; WONGKONGKATEP, J.; PONGTHARANGKUL, T.; SUPHANTHARIKA, M. Influence of pH and ionic strength on the physical and rheological properties and stability of whey protein stabilized o/w

emulsions containing xanthan gum. **Journal of Food Engineering**, v. 242, p. 141–152, 2018.

SUGAHARA, T.; ONDA, H.; SHINOHARA, Y.; et al. Immunostimulation effects of proteose-peptone component 3 fragment on human hybridomas and peripheral blood lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1725, n. 2, p. 233–240, 2005.

SUN, X. M.; WANG, C. N.; GUO, M. R. Interactions between whey protein or polymerized whey protein and soybean lecithin in model system. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 11, p. 9680–9692, 2018.

SUREL, C.; FOUCQUIER, J.; PERROT, N.; et al. Composition and structure of interface impacts texture of O/W emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 34, p. 3–9, 2014.

SZYMANSKA, K.; BRYJAK, J.; MROWIEC-BIALON, J.; JARZEBSKI, A. B. Application and properties of siliceous mesostructured cellular foams as enzymes carriers to obtain sufficient biocatalysts. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 99, p. 167–175, 2007.

SZYMAŃSKA, K.; BRYJAK, J.; MROWIEC-BIAŁOŃ, J.; JARZEBSKI, A. B. Application and properties of siliceous mesostructured cellular foams as enzymes carriers to obtain efficient biocatalysts. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 99, n. 1–2, p. 167–175, 2007.

TADROS, T. F. **Emulsion Formation and Stability**. Weinheim-Alemanha: Wiley-VCH, 2013.

TAMIME, A. Y. **Membrane Processing: Dairy and Beverage Applications**. First Edit ed. Ayr, UK: Wiley Blackwell Publishing Ltd., 2013.

TAQIEDDIN, E.; AMIJI, M. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules. **Biomaterials**, v. 25, n. 10, p. 1937–1945, 2004.

TCHOLAKOVA, S.; DENKOV, N. D.; SIDZHAKOVA, D.; IVANOV, I. B.; CAMPBELL, B. Effects of electrolyte concentration and pH on the coalescence stability of β -lactoglobulin emulsions: experiment and interpretation. **Langmuir**, v. 21, p. 4842–4855, 2005.

THUM, C.; COOKSON, A.; MCNABB, W. C.; ROY, N. C.; OTTER, D. Composition and enrichment of caprine milk oligosaccharides from New Zealand Saanen goat cheese whey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 42, p. 30–37, 2015.

TOMÁS, C. M. **Estudo da hidrólise da lactose por b-galactosidase na forma livre e imobilizada**, 1988. Universidade Federal de Uberlândia.

TOMASZEWSKA, M.; BIAŁOŃCZYK, L. Ethanol production from whey in a bioreactor coupled with direct contact membrane distillation. **Catalysis Today**, v. 268, p. 156–163, 2016.

TOMCZYŃSKA-MLEKO, M.; KAMYSZ, K.; SIKORSKA, E.; et al. Changes of Secondary Structure and Surface Tension of Whey Protein Isolate Dispersions upon pH and Temperature. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 32, n. 1, p. 82–89, 2014.

TORKAMANZADEH, M.; JAHANSHAHI, M.; PEYRAVI, M.; RAD, A. S. Comparative experimental study on fouling mechanisms in nano-porous membrane: Cheese whey ultrafiltration as a case study. **Water Science and Technology**, v. 74, n. 12, p. 2737–2750, 2016.

TORRES, I. C.; AMIGO, J. M.; KNUDSEN, J. C.; et al. Rheology and microstructure of low-fat yoghurt produced with whey protein microparticles as fat replacer. **International Dairy Journal**, v. 81, p. 62–71, 2018.

TORRES, P.; BATISTA-VIERA, F. Improved biocatalysts based on *Bacillus circulans* β -galactosidase immobilized onto epoxy-activated acrylic supports: Applications in whey processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 83, p. 57–64, 2012.

TREVAN, M. **Techniques of immobilization. In immobilized enzymes. An introduction and applications in biotechnology.** Chichester, New York: Wiley, 1980.

TRIGUEROS, D. E. G.; FIORESE, M. L.; KROUMOV, A. D.; et al. Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 110, p. 71–83, 2016.

TSAKALI, E.; PETROTOS, K.; D'ALESSANDRO, A. G.; et al. Exploring the Effect of Ultrafiltration/Diafiltration Processing Conditions on the Lactoferrin and Immunoglobulin G Content of Feta Whey Protein Concentrates. **Journal of Food Process Engineering**, v. 38, n. 4, p. 363–373, 2015.

USDA. USDA COMMODITY REQUIREMENTS DOCUMENT: Dried dairy ingredients for use in international food assistance programs. Disponível em: <https://www.fsa.usda.gov/Internet/FSA_File/ddi2.pdf>. Acesso em: 1/6/2019.

USDA. United States Department of Agriculture. Agriculture Research Service, Food Composition Databases. .

USDEC. United States Dairy Export Council. Dairy Ingredients Application Library – WPC & WPI. Disponível em: <<http://www.usdec.org/Library/DIAL.cfm>>. Acesso em: 4/3/2018.

USHIKUBO, F. Y.; WATANABE, A. P.; VIOTTO, L. A. Microfiltration of umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.) juice using polypropylene membrane. **Desalination**, v. 200, n. 1–3, p. 549–551, 2006.

VASILEVA, N.; IOTOV, V.; IVANOV, Y.; GODJEVARGOVA, T.; KOTIA, N. Immobilization of β -galactosidase on modified polypropylene membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 710–719, 2012.

VASILEVA, N.; IVANOV, Y.; DAMYANOVA, S.; KOSTOVA, I.; GODJEVARGOVA, T. Hydrolysis of whey lactose by immobilized β -galactosidase in a bioreactor with a spirally wound membrane. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 339–346, 2016.

VERMA, M. L.; BARROW, C. J.; KENNEDY, J. F.; PURI, M. Immobilization of β -d-

galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on functionalized silicon dioxide nanoparticles: Characterization and lactose hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 2, p. 432–437, 2012.

VICENTE, J.; PEREIRA, L. J. B.; BASTOS, L. P. H.; DE CARVALHO, M. G.; GARCIA-ROJAS, E. E. Effect of xanthan gum or pectin addition on Sacha Inchi oil-in-water emulsions stabilized by ovalbumin or tween 80: Droplet size distribution, rheological behavior and stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 339–345, 2018.

VIEIRA, D. C. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**, 2009. Universidade Federal de São carlos.

VILLA, C.; COSTA, J.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; MAFRA, I. Bovine Milk Allergens: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 1, p. 137–164, 2018.

WISEU, M. I.; MELO, E. P.; CARVALHO, T. I.; CORREIA, R. F.; COSTA, S. M. Unfolding kinetics of beta-lactoglobulin induced by surfactant and denaturant: A stopped-flow/fluorescence study. **Biophysical Journal**, v. 93, p. 3601–3612, 2007.

VLACHY, N.; TOURAUD, D.; HEILMANN, J.; KUNZ, W. Determining the cytotoxicity of cationic surfactant mixtures on HeLa cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 70, p. 278–280, 2009.

VRESE, M. DE; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C. Probiotics—compensation for lactase insufficiency 1–3. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 421–429, 2001.

WARSINGER, D. M.; SWAMINATHAN, J.; GUILLEN-BURRIEZA, E.; ARAFAT, H. A.; LIENHARD V, J. H. Scaling and fouling in membrane distillation for desalination applications: A review. **Desalination**, v. 356, p. 294–313, 2015.

WINGERD, W. H. Lactalbumin as a food ingredient. **Journal Dairy Science**, v. 54, p. 1234–1236, 1971.

WONG, N. P.; JENNESS, R.; KEENEY, M.; MARTH, E. H. **Fundamentals of Dairy Chemistry**. Third edit ed. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publishers, Inc, 1999.

YADA, R. . **Protein in food processing**. England: Woodhead Publishing, 2004.

YADAV, J. S. S.; YAN, S.; AJILA, C. M.; et al. Food-grade single-cell protein production, characterization and ultrafiltration recovery of residual fermented whey proteins from whey. **Food and Bioproducts Processing**, v. 99, p. 156–165, 2016.

YAHŞI, A.; ŞAHİN, F.; DEMIREL, G.; TÜMTÜRK, H. Binary immobilization of tyrosinase by using alginate gel beads and poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, n. 4, p. 253–258, 2005.

YORGUN, M. S.; BALCIOGLU, I. A.; SAYGIN, O. Performance comparison of ultrafiltration, nanofiltration and reverse osmosis on whey treatment. **Desalination**, v. 229, p. 204–216, 2008.

ZHU, Y.; CHEN, X.; MCCLEMENTS, D. J.; ZOU, L.; LIU, W. pH-, ion- and temperature-dependent emulsion gels: Fabricated by addition of whey protein to gliadin-nanoparticle coated lipid droplets. **Food Hydrocolloids**, v. 77, p. 870–878, 2017.

ZIEGLER, F. L. .; SGARBIERI, V. C. Caracterização químico-nutricional de um isolado proteico de soro de leite, um hidrolisado de colágeno bovino e misturas dos dois produtos. **Revista de Nutrição**, v. 22, p. 61–70, 2009.